

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Assistant Commissioner for Patents
United States Patent and Trademark
Office
Box PCT
Washington, D.C. 20231
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 23 October 2000 (23.10.00)	
International application No. PCT/EP00/01405	Applicant's or agent's file reference P14PCT
International filing date (day/month/year) 21 February 2000 (21.02.00)	Priority date (day/month/year) 22 February 1999 (22.02.99)
Applicant EGGELING, Lothar et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

20 September 2000 (20.09.00)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was

☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Manu Berrod
Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Telephone No.: (41-22) 338.83.38



**REVISED AMENDMENT PRACTICE: 37 CFR 1.121 CHANGED
COMPLIANCE IS MANDATORY - Effective Date: July 30, 2003**

All amendments filed on or after the effective date noted above must comply with revised 37 CFR 1.121. See Final Rule: **Changes To Implement Electronic Maintenance of Official Patent Application Records** (68 Fed. Reg. 38611 (June 30, 2003)), posted on the Office's website at: <http://www.uspto.gov/web/patents/ifw/> with related information. The amendment practice set forth in revised 37 CFR 1.121, and described below, replaces the voluntary revised amendment format available to applicants since February 2003. **NOTE: STRICT COMPLIANCE WITH THE REVISED 37 CFR 1.121 IS REQUIRED AS OF THE EFFECTIVE DATE (July 30, 2003).** The Office will notify applicants of amendments that are not accepted because they do not comply with revised 37 CFR 1.121 via a Notice of Non-Compliant Amendment. See MPEP 714.03 (Rev. 1, Feb. 2003). The non-compliant section(s) will have to be corrected and the entire corrected section(s) resubmitted within a set period.

Bold underlined italic font has been used below to highlight the major differences between the revised 37 CFR 1.121 and the voluntary revised amendment format that applicants could use since February, 2003.

Note: The amendment practice for reissues and reexamination proceedings, except for drawings, has not changed.

REVISED AMENDMENT PRACTICE

I. Begin each section of an amendment document on a separate sheet:

Each section of an amendment document (e.g., Specification Amendments, Claim Amendments, Drawing Amendments, and Remarks) must begin on a separate sheet. Starting each separate section on a new page will facilitate the process of separately indexing and scanning each section of an amendment document for placement in an image file wrapper.

II. Two versions of amended part(s) no longer required:

37 CFR 1.121 has been revised to **no longer require** two versions (a clean version and a marked up version) of each replacement paragraph or section, or amended claim. Note, however, the requirements for a clean version and a marked up version for **substitute specifications** under 37 CFR 1.125 have been retained.

A) Amendments to the claims:

Each amendment document that includes a change to an existing claim, cancellation of a claim or submission of a new claim, **must include a complete listing** of all claims in the application. After each claim number in the listing, the status must be indicated in a parenthetical expression, and the **text of each pending claim** (with markings to show **current changes**) must be presented. The claims in the listing will replace all prior claims in the application.

- (1) The current status of all of the claims in the application, including any previously canceled, not entered or withdrawn claims, must be given in a parenthetical expression following the claim number using only one of the following seven status identifiers: (original), (currently amended), (canceled), (withdrawn), (new), **(previously presented) and (not entered)**. The text of all pending claims, **including withdrawn claims**, must be submitted each time any claim is amended. Canceled **and not entered** claims must be indicated by only the claim number and status, without presenting the text of the claims.
- (2) The text of all claims **being currently amended** must be presented in the claim listing with markings to indicate the changes that have been made relative to the immediate prior version. The changes in any amended claim must be shown by underlining (for added matter) or strikethrough (for deleted matter) with 2 exceptions: (1) for **deletion of five characters or fewer, double brackets may be used (e.g., [[error]]**; and (2) if **strikethrough cannot be easily perceived (e.g., deletion of the number "4" or certain punctuation marks), double brackets must be used (e.g., [[4]])**. **As an alternative to using double brackets, however, extra portions of text may be included before and after text being deleted, all in strikethrough, followed by including and underlining the extra text with the desired change (e.g., number 4 as number 14 as)**. An accompanying clean version is not required and should not be presented. Only claims of the status "currently amended," and "withdrawn" that are being amended, may include markings.
- (3) The text of pending claims **not being currently amended, including withdrawn claims**, must be presented in the claim listing in clean version, i.e., without any markings. Any claim text presented in clean version will constitute an assertion that it has not been changed relative to the immediate prior version except to omit markings that may have been present in the immediate prior version of the claims.

- (4) A claim being canceled must be listed in the claim listing with the status identifier "canceled"; the text of the claim must not be presented. Providing an instruction to cancel is optional.
- (5) Any claims added by amendment must be presented in the claim listing with the status identifier "(new)"; the text of the claim must not be underlined.
- (6) All of the claims in the claim listing must be presented in ascending numerical order. Consecutive canceled, or not entered, claims may be aggregated into one statement (e.g., Claims 1 – 5 (canceled)).

Example of listing of claims (use of the word "claim" before the claim number is optional):

Claims 1-5 (canceled)

Claim 6 (previously presented): A bucket with a handle.

Claim 7 (withdrawn): A handle comprising an elongated wire.

Claim 8 (withdrawn): The handle of claim 7 further comprising a plastic grip.

Claim 9 (currently amended): A bucket with a ~~green~~ blue handle.

Claim 10 (original): The bucket of claim 9 wherein the handle is made of wood.

Claim 11 (canceled)

Claim 12 (not entered)

Claim 13 (new): A bucket with plastic sides and bottom.

B) Amendments to the specification:

Amendments to the specification, including the abstract, must be made by presenting a replacement paragraph or section or abstract marked up to show changes made relative to the immediate prior version. An accompanying clean version is not required and should not be presented. Newly added paragraphs or sections, including a new abstract (instead of a replacement abstract), must not be underlined. A replacement or new abstract must be submitted on a separate sheet, 37 CFR 1.72. If a substitute specification is being submitted to incorporate extensive amendments, both a clean version (which will be entered) and a marked up version must be submitted as per 37 CFR 1.125.

The changes in any replacement paragraph or section, or substitute specification must be shown by underlining (for added matter) or strikethrough (for deleted matter) with 2 exceptions: (1) for deletion of five characters or fewer, double brackets may be used (e.g., [[eroor]]); and (2) if strikethrough cannot be easily perceived (e.g., deletion of the number "4" or certain punctuation marks), double brackets must be used (e.g., [[4]]). As an alternative to using double brackets, however, extra portions of text may be included before and after text being deleted, all in strikethrough, followed by including and underlining the extra text with the desired change (e.g., ~~number 14~~ as number 14 as)

C) Amendments to drawing figures:

Drawing changes must be made by presenting replacement figures which incorporate the desired changes and which comply with 37 CFR 1.84. An explanation of the changes made must be presented either in the drawing amendments, or remarks, section of the amendment, and may be accompanied by a marked-up copy of one or more of the figures being amended, with annotations. Any replacement drawing sheet must be identified in the top margin as "Replacement Sheet" and include all of the figures appearing on the immediate prior version of the sheet, even though only one figure may be amended. Any marked-up (annotated) copy showing changes must be labeled "Annotated Marked-up Drawings" and accompany the replacement sheet in the amendment (e.g., as an appendix). The figure or figure number of the amended drawing(s) must not be labeled as "amended." If the changes to the drawing figure(s) are not accepted by the examiner, applicant will be notified of any required corrective action in the next Office action. No further drawing submission will be required, unless applicant is notified.

Questions regarding the submission of amendments pursuant to the revised practice set forth in this flyer should be directed to: Elizabeth Dougherty or Gena Jones, Legal Advisors, or Joe Narcavage, Senior Special Projects Examiner, Office of Patent Legal Administration, by e-mail to patentpractice@uspto.gov or by phone at (703) 305-1616.

VERTRAG ÜBER INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

REC'D 22 JAN 2001

WIPO

PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts P14PCT	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP00/01405	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 21/02/2000	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 22/02/1999
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C12P13/06		
Anmelder FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH GMBH et al.		



- Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
- Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 5 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.

☒ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

 Diese Anlagen umfassen insgesamt 4 Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☐ Priorität
- III ☐ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☒ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☐ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 20/09/2000	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 18.01.2001
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter Donovan-Beermann, T Tel. Nr. +49 89 2399 8213 

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP00/01405

I. Grundlage des Berichts

1. Dieser Bericht wurde erstellt auf der Grundlage (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten.*):

Beschreibung, Seiten:

1-28 ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

1-16 eingegangen am 21/12/2000 mit Schreiben vom 19/12/2000

Zeichnungen, Blätter:

1/3-3/3 ursprüngliche Fassung

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um

- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- ☐ die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- ☐ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- ☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- ☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP00/01405

☐ Beschreibung, Seiten:

☐ Ansprüche, Nr.:

☐ Zeichnungen, Blatt:

5. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen).

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche	1-16
	Nein: Ansprüche	
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	1-16
	Nein: Ansprüche	
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche	1-16
	Nein: Ansprüche	

2. Unterlagen und Erklärungen siehe Beiblatt

VII. Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung

Es wurde festgestellt, daß die internationale Anmeldung nach Form oder Inhalt folgende Mängel aufweist:
siehe Beiblatt

Die vorliegende Anmeldung betrifft Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von L-Valin, wobei zumindest die Dihydroxysäurehydratase- (ilv-D-) Aktivität und/oder die ilvD Genexpression in einem Mikroorganismus verstärkt wird. Zusätzlich kommen Mikroorganismen in Frage, in denen die Aktivität zumindest eines Enzyms, das an einem Stoffwechselweg beteiligt ist, der die L-Valin herabsetzt, abgeschwächt oder ausgeschaltet ist.

Die geänderten Ansprüche, wie eingereicht, erfüllen die Erfordernisse des Artikels 34(2)(b) PCT.

EP-A-136359 (D1) offenbart die Herstellung von Aminosäuren mittels gen-manipuliertem *Corynebacterium glutamicum* (siehe Seite 2). L-Histidin, Tryptophan, Phenylalanin, L-Isoleucin, L-Tyrosin und L-Arginin werden hergestellt.

EP-A-365739 (D2, in der Anmeldung zitiert) offenbart die Aufnahme von Acetohydroxysäuresynthase in Mikroorganismen wie *Corynebacterium glutamicum* und die dadurch erhöhte Produktion von L-Valin in solche Mikroorganismen.

EP-A-436886 (D3) offenbart, daß zum Zwecke einer erhöhten Produktion von L-Isoleucin, Corynebakterien mit für Threonindehydratase (ilvA), Acetohydroxysäuresynthase (ilvBN) und gegebenenfalls Isomero-reduktase (ilvC) kodierende Gene transformiert werden (siehe Seite 2, Zeilen 36-41). Die Gene können einzeln oder in Kombination verwendet werden.

EP-A-872547 (D4) offenbart, daß bei *Escherichia* Mikroorganismen, die Produktion von L-Valin durch eine Modifikation des H⁺ATP-Gens erhöht werden kann. Das Gen kann auch das ilvA-Gen einschliessen.

Journal of Bacteriology, 1993, Band 175, Nr.17, Seiten 5595-5603 (D5) offenbart, daß Acetohydroxysäuresynthase und Isomero-reduktase (ilvC) Katalysatoren sind für nacheinanderfolgende Reaktionen im Weg zu u.a. Valin in *Corynebacterium glutamicum*. Acetohydroxysäuresynthase wird durch zwei Gene kodiert, ilvB und ilvN.

Nucleic Acids Research, 1987, Band 15, Nr.5, Seiten 2137-2155 (D6) offenbart die Sequenzierung des ilvGMEDA Operons von *E.coli*, das 5 Gene enthält, die für 4 von

den 5 Enzymen kodieren, die für die Biosynthese von L-Valin notwendig sind.

Gene, 1993, Band 137, Seiten 179-185 (D7) offenbart die Sequenzierung vom *ilv3* Gen in *Saccharomyces cerevisiae*, das für Dihydroxysäurehydratase-Biosynthese notwendig ist.

Biosis Zusammenfassung PREV199395129991 & J.Molecular Evolution, 1993, Band 36, Seiten 308-314 (D8) betrifft die Synthese von Vitamin-Coenzymen.

Applied and Environmental Biology, Mai 1999, Band 65, Nr.5, Seiten 1973-1979, ist nicht relevant, da die vorliegende Anmeldung von der Priorität von 22.02.1999 im vollen Umfang gestützt ist.

Es gibt im Stand der Technik weder eine Offenbarung noch einen Hinweis darauf, dass eine erhöhte Produktion von L-Valin in Mikroorganismen durch die Verstärkung von Dihydroxysäurehydratase- (*ilvD*-) Aktivität und/oder die *ilvD* Genexpression erzielt werden könnte. Der Gegenstand der vorliegenden Ansprüche 1-16 ist daher neu und erfinderisch gegenüber dem Stand der Technik (Art.33(2) und (3) PCT).

Ad Teil VII:

Im Widerspruch zu den Erfordernissen der Regel 5.1 a) ii) PCT werden in der Beschreibung weder der in den Dokumenten D4-D7 offenbarte einschlägige Stand der Technik noch diese Dokumente angegeben.

Die Beschreibung steht nicht, wie in Regel 5.1 a) iii) PCT vorgeschrieben, in Einklang mit den Ansprüchen.

N e u e P a t e n t a n s p r ü c h e

1. Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von L-Valin, bei dem die Dihydroxysäuredehydratase-(ilvD-) Aktivität und/oder die ilvD-Genexpression in einem Mikroorganismus verstärkt wird.
- 5 2. Verfahren nach Anspruch 1, bei dem zusätzlich die Acetohydroxysäuresynthase-(ilvBN-) und Isomeroreduktase-(ilvC-) Aktivität und/oder ilvBNC-Genexpression im Mikroorganismus verstärkt wird.
- 10 3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die endogene ilvD- oder ilvBNCD-Aktivität im Mikroorganismus erhöht wird.
- 15 4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß durch Mutation des endogenen ilvD-Gens oder der ilvBNCD-Gene entsprechende Enzyme mit höherer Aktivität erzeugt werden.
- 20 5. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die ilvD- oder ilvBNCD-Genexpression durch Erhöhen der Genkopienzahl verstärkt wird.

- 1
-
6. Verfahren nach Anspruch 5,
dadurch gekennzeichnet,
daß zur Erhöhung der Genkopienzahl das ilvD-Gen
oder die ilvBNCD-Gene in ein Genkonstrukt einge-
baut werden.
- 5
7. Verfahren nach Anspruch 6,
dadurch gekennzeichnet,
daß ein Mikroorganismus mit dem das ilvD-Gen oder
die ilvBNCD-Gene enthaltende Genkonstrukt trans-
formiert wird.
- 10
8. Verfahren nach Anspruch 7,
dadurch gekennzeichnet,
daß als Mikroorganismus *Corynebacterium glutamicum*
verwendet wird.
- 15
9. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehen-
den Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß ein Mikroorganismus verwendet wird, in dem die
Aktivität zumindest eines Enzyms, das an einem
Stoffwechselweg beteiligt ist, der die L-Valin-
Bildung herabsetzt, abgeschwächt oder ausgeschaltet
ist.
- 20
10. Verfahren nach Anspruch 9,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Aktivität des an der Synthese von L-Iso-
leucin beteiligten Enzyms Threonindehydratase
(ilvA) abgeschwächt oder ausgeschaltet ist.
- 25

11. Verfahren nach Anspruch 9 oder 10,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Aktivität eines oder mehrerer, an der Syn-
these von D-Pantothenat spezifisch beteiligter,
5 Enzyme abgeschwächt oder ausgeschaltet ist.
12. Verfahren nach Anspruch 11,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Aktivität des Enzyms Ketopantoathydroxy-
methyltransferase (pan B) und/oder des Enzyms
10 Pantothenatligase (pan C) abgeschwächt oder ausge-
schaltet ist.
13. Mit einem Genkonstrukt, enthaltend das ilvD-Gen
oder die ilvBNCD-Gene, transformierter Mikroorga-
nismus, in dem die Aktivität eines oder mehrerer,
15 an der Synthese von D-Pantothenat spezifisch be-
teiligter, Enzyme abgeschwächt oder ausgeschaltet
ist.
14. Transformierter Mikroorganismus nach Anspruch 13,
in dem die Aktivität des Enzyms Ketopantoathydro-
20 xymethyltransferase (pan B) und/oder des Enzyms
Pantothenatligase (pan C) abgeschwächt oder ausge-
schaltet ist.
15. Transformierter Mikroorganismus nach Anspruch 13
oder 14, in dem die Aktivität des an der Synthese
25 von L-Isoleucin beteiligten Enzyms Threoninde-
hydratase (ilvA) abgeschwächt oder ausgeschaltet
ist.

16. Transformierter Mikroorganismus nach einem oder
mehreren der Ansprüche 13 bis 15,
gekennzeichnet durch *Corynebacterium glutamicum*.

Translation

09/914006

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference P14PCT	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/EP00/01405	International filing date (day/month/year) 21 February 2000 (21.02.00)	Priority date (day/month/year) 22 February 1999 (22.02.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12P 13/06, C12N 1/21		
Applicant FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH GMBH		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of <u>5</u> sheets, including this cover sheet. <input checked="" type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT). These annexes consist of a total of <u>4</u> sheets.
3. This report contains indications relating to the following items: I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report II <input type="checkbox"/> Priority III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited VII <input checked="" type="checkbox"/> Certain defects in the international application VIII <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 20 September 2000 (20.09.00)	Date of completion of this report 18 January 2001 (18.01.2001)
Name and mailing address of the IPEA/EP Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP00/01405

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of (*Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.*):

- ☐ the international application as originally filed.
- ☒ the description, pages 1-28, as originally filed,
 pages _____, filed with the demand,
 pages _____, filed with the letter of _____,
 pages _____, filed with the letter of _____.
- ☒ the claims, Nos. _____, as originally filed,
 Nos. _____, as amended under Article 19,
 Nos. _____, filed with the demand,
 Nos. 1-16, filed with the letter of 19 December 2000 (19.12.2000),
 Nos. _____, filed with the letter of _____.
- ☒ the drawings, sheets/fig 1/3-3/3, as originally filed,
 sheets/fig _____, filed with the demand,
 sheets/fig _____, filed with the letter of _____,
 sheets/fig _____, filed with the letter of _____.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP 00/01405

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-16	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-16	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-16	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

The present application relates to processes for microbial production of L-valine in which at least the dihydroxy acid hydratase (*ilvD*) activity and/or the *ilvD* gene expression in a microorganism is strengthened. In addition, microorganisms are considered in which the activity of at least one enzyme involved in a metabolic pathway that reduces L-valine is inhibited or switched off.

The amended claims as submitted satisfy the requirements of PCT Article 34(2)(b).

EP-A-136 359 (D1) discloses the production of amino acids by means of genetically manipulated *Corynebacterium glutamicum* (see page 2).

L-histidine, tryptophan, phenylalanine, L-isoleucine,
L-tyrosine, and L-arginine are produced.

EP-A-365 739 (D2, cited in the application) discloses the capture of acetohydroxy acid synthase in microorganisms such as *Corynebacterium glutamicum* and the resultant increase in production of L-valine in such microorganisms.

EP-A-436 886 (D3) discloses that, to the end of increasing the production of L-isoleucine, *Corynebacteria* are transformed using threonine dehydratase (*ilvA*), acetohydroxyacid synthase (*ilvBN*), and possibly isomer reductase (*ilvC*) coding genes (see page 2, lines 36-41). The genes can be used singly or in combination.

EP-A-872 547 (D4) discloses that in *Escherichia* microorganisms, the production of L-valine can be increased by modifying the H⁺ATP gene. Said gene can also include the *ilvA*-gene.

The Journal of Bacteriology, 1993, Vol. 175, No. 17, pages 5595-5603 (D5) discloses that acetohydroxy acid synthase and isomer reductase (*ilvC*) are catalysts necessary for sequential reactions in the path to, among others, valine in *Corynebacterium glutamicum*. Acetohydroxy acid synthesis is encoded by two genes, *ilvB* and *ilvN*.

Nucleic Acids Research, 1987, Vol. 15, No. 5, pages 2137-2155 (D6) discloses the sequencing of *ilvGMEDA* operons of *E.Coli*, which contains five genes that encode four of the five enzymes necessary for the biosynthesis of L-valine.

Gene, 1993, Vol. 137, pages 179-185 (D7) discloses the sequencing of the *ilv3* gene in *Saccharomyces cerevisiae* that is necessary for dihydroxy acid hydratase biosynthesis.

The Biosis abstract PREV199395129991 & J. Molecular Evolution, 1993, Vol. 36, pages 308-314 (D8), relates to synthesis of vitamin coenzymes.

Applied and Environmental Biology, May 1999, Vol. 65, No. 5, pages 1973-1979, is not relevant because the entire scope of the present application is supported by the priority of 22 February 1999.

The present prior art neither discloses nor suggests that strengthening dihydroxy acid hydratase (ilv-D) activity and/or ilvD gene expression could increase production of L-valine in microorganisms. The subject matter of the present Claims 1-16 is thus novel and inventive with respect to the prior art (PCT Article 32(2) and (3)).

VII. Certain defects in the international application

The following defects in the form or contents of the international application have been noted:

Contrary to PCT Rule 5.1(a)(ii), the description does not cite documents D4-D7 or indicate the relevant prior art disclosed therein.

The description is not consistent with the claims (PCT Rule 5.1(a)(iii)).

PCT

PT 1.1678 (JÜLICH-13) (5899*13)

ANTRAG

(4) pages In German

Der Unterzeichnete beantragt, daß die vorliegende internationale Anmeldung nach dem Vertrag über die internationale Zusammenarbeit auf dem Gebiet des Patentwesens behandelt wird.

Vom Anmeldeamt auszufüllen

Internationales Aktenzeichen

097914006

Internationales Anmeldedatum

Name des Anmeldeamts und "PCT International Application"

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts (falls gewünscht)
(max. 12 Zeichen) P14PCT

Feld Nr. I BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG

Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von L-Valin

Feld Nr. II ANMELDER

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

Forschungszentrum Jülich GmbH
Postfach 1913
D-52425 Jülich

Deutschland

☐ Diese Person ist gleichzeitig Erfinder

Telefonnr.:

++49-(0)2461-61-4480

Telefaxnr.:

++49-(0)2461-61-2860

Fernschreibnr.:

Staatsangehörigkeit (Staat):

DE

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

DE

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

☐ alle Bestimmungsstaaten

☒ alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika

☐ nur die Vereinigten Staaten von Amerika

☐ die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

Feld Nr. III WEITERE ANMELDER UND/ODER (WEITERE) ERFINDER

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

Eggeling, Lothar
Elsenkamp 6
D-52428 Jülich

Deutschland

Diese Person ist:

☐ nur Anmelder

☒ Anmelder und Erfinder

☐ nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat):

DE

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

DE

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

☐ alle Bestimmungsstaaten

☐ alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika

☒ nur die Vereinigten Staaten von Amerika

☐ die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

☒ Weitere Anmelder und/oder (weitere) Erfinder sind auf einem Fortsetzungsblatt angegeben.

Feld Nr. IV ANWALT ODER GEMEINSAMER VERTRETER; ZUSTELLANSCHRIFT

Die folgende Person wird hiermit bestellt/ist bestellt worden, um für den (die) Anmelder vor den zuständigen internationalen Behörden in folgender Eigenschaft zu handeln als: ☒ Anwalt ☐ gemeinsamer Vertreter

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.)

Pielken, Petra
Becker-Gundahl-Str. 36
D-81479 München

Deutschland

Telefonnr.:

++49-(0)89-8565-1332

Telefaxnr.:

++49-(0)89-8565-1333

Fernschreibnr.:

☐ **Zustellanschrift:** Dieses Kästchen ist anzukreuzen, wenn kein Anwalt oder gemeinsamer Vertreter bestellt ist und statt dessen im obigen Feld eine spezielle Zustellanschrift angegeben ist.

Fortsetzung von Feld Nr. III WEITERE ANMELDER UND/ODER (WEITERE) ERFINDER

Wird keines der folgenden Felder benutzt, so sollte dieses Blatt dem Antrag nicht beigelegt werden.

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

Sahm, Hermann
Wendelinusstr. 71
D-52428 Jülich

Deutschland

Diese Person ist:

☐ nur Anmelder

☒ Anmelder und Erfinder

☐ nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat):

DE

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

DE

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

☐ alle Bestimmungsstaaten

☐ alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika

☒ nur die Vereinigten Staaten von Amerika

☐ die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

Diese Person ist:

☐ nur Anmelder

☐ Anmelder und Erfinder

☐ nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat):

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

☐ alle Bestimmungsstaaten

☐ alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika

☐ nur die Vereinigten Staaten von Amerika

☐ die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

Diese Person ist:

☐ nur Anmelder

☐ Anmelder und Erfinder

☐ nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat):

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

☐ alle Bestimmungsstaaten

☐ alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika

☐ nur die Vereinigten Staaten von Amerika

☐ die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

Diese Person ist:

☐ nur Anmelder

☐ Anmelder und Erfinder

☐ nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat):

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

☐ alle Bestimmungsstaaten

☐ alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika

☐ nur die Vereinigten Staaten von Amerika

☐ die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

☐ Weitere Anmelder und/oder (weitere) Erfinder sind auf einem zusätzlichen Fortsetzungsblatt angegeben.



Feld Nr. V BESTIMMUNG VON STAATEN

Die folgenden Bestimmungen nach Regel 4.9 Absatz a werden hiermit vorgenommen (bitte die entsprechenden Kästchen ankreuzen; wenigstens ein Kästchen muß angekreuzt werden):

Regionales Patent

- ☐ **AP ARIPO-Patent:** GH Ghana, GM Gambia, KE Kenia, LS Lesotho, MW Malawi, SD Sudan, SL Sierra Leone, SZ Swasiland, UG Uganda, ZW Simbabwe und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Harare-Protokolls und des PCT ist
- ☐ **EA Eurasisches Patent:** AM Armenien, AZ Aserbaidschan, BY Belarus, KG Kirgisistan, KZ Kasachstan, MD Republik Moldau, RU Russische Föderation, TJ Tadschikistan, TM Turkmenistan und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Eurasischen Patentübereinkommens und des PCT ist
- ☒ **EP Europäisches Patent:** AT Österreich, BE Belgien, CH und LI Schweiz und Liechtenstein, CY Zypern, DE Deutschland, DK Dänemark, ES Spanien, FI Finnland, FR Frankreich, GB Vereinigtes Königreich, GR Griechenland, IE Irland, IT Italien, LU Luxemburg, MC Monaco, NL Niederlande, PT Portugal, SE Schweden und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Europäischen Patentübereinkommens und des PCT ist
- ☐ **OA OAPI-Patent:** BF Burkina Faso, BJ Benin, CF Zentralafrikanische Republik, CG Kongo, CI Côte d'Ivoire, CM Kamerun, GA Gabun, GN Guinea, GW Guinea-Bissau, ML Mali, MR Mauretanien, NE Niger, SN Senegal, TD Tschad, TG Togo und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat der OAPI und des PCT ist (falls eine andere Schutzrechtsart oder ein sonstiges Verfahren gewünscht wird, bitte auf der gepunkteten Linie angeben)

Nationales Patent (falls eine andere Schutzrechtsart oder ein sonstiges Verfahren gewünscht wird, bitte auf der gepunkteten Linie angeben):

- | | |
|---|---|
| <input type="checkbox"/> AE Vereinigte Arabische Emirate | <input type="checkbox"/> LR Liberia |
| <input type="checkbox"/> AL Albanien | <input type="checkbox"/> LS Lesotho |
| <input type="checkbox"/> AM Armenien | <input type="checkbox"/> LT Litauen |
| <input type="checkbox"/> AT Österreich | <input type="checkbox"/> LU Luxemburg |
| <input type="checkbox"/> AU Australien | <input type="checkbox"/> LV Lettland |
| <input type="checkbox"/> AZ Aserbaidschan | <input type="checkbox"/> MD Republik Moldau |
| <input type="checkbox"/> BA Bosnien-Herzegowina | <input type="checkbox"/> MG Madagaskar |
| <input type="checkbox"/> BB Barbados | <input type="checkbox"/> MK Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien |
| <input type="checkbox"/> BG Bulgarien | <input type="checkbox"/> MN Mongolei |
| <input type="checkbox"/> BR Brasilien | <input type="checkbox"/> MW Malawi |
| <input type="checkbox"/> BY Belarus | <input type="checkbox"/> MX Mexiko |
| <input type="checkbox"/> CA Kanada | <input type="checkbox"/> NO Norwegen |
| <input type="checkbox"/> CH und LI Schweiz und Liechtenstein | <input type="checkbox"/> NZ Neuseeland |
| <input type="checkbox"/> CN China | <input type="checkbox"/> PL Polen |
| <input type="checkbox"/> CU Kuba | <input type="checkbox"/> PT Portugal |
| <input checked="" type="checkbox"/> CZ Tschechische Republik | <input type="checkbox"/> RO Rumänien |
| <input type="checkbox"/> DE Deutschland | <input type="checkbox"/> RU Russische Föderation |
| <input type="checkbox"/> DK Dänemark | <input type="checkbox"/> SD Sudan |
| <input type="checkbox"/> EE Estland | <input type="checkbox"/> SE Schweden |
| <input type="checkbox"/> ES Spanien | <input type="checkbox"/> SG Singapur |
| <input type="checkbox"/> FI Finnland | <input type="checkbox"/> SI Slowenien |
| <input type="checkbox"/> GB Vereinigtes Königreich | <input checked="" type="checkbox"/> SK Slowakei |
| <input type="checkbox"/> GD Grenada | <input type="checkbox"/> SL Sierra Leone |
| <input type="checkbox"/> GE Georgien | <input type="checkbox"/> TJ Tadschikistan |
| <input type="checkbox"/> GH Ghana | <input type="checkbox"/> TM Turkmenistan |
| <input type="checkbox"/> GM Gambia | <input type="checkbox"/> TR Türkei |
| <input type="checkbox"/> HR Kroatien | <input type="checkbox"/> TT Trinidad und Tobago |
| <input type="checkbox"/> HU Ungarn | <input type="checkbox"/> UA Ukraine |
| <input type="checkbox"/> ID Indonesien | <input type="checkbox"/> UG Uganda |
| <input type="checkbox"/> IL Israel | <input checked="" type="checkbox"/> US Vereinigte Staaten von Amerika |
| <input type="checkbox"/> IN Indien | <input type="checkbox"/> UZ Usbekistan |
| <input type="checkbox"/> IS Island | <input type="checkbox"/> VN Vietnam |
| <input checked="" type="checkbox"/> JP Japan | <input type="checkbox"/> YU Jugoslawien |
| <input type="checkbox"/> KE Kenia | <input checked="" type="checkbox"/> ZA Südafrika |
| <input type="checkbox"/> KG Kirgisistan | <input type="checkbox"/> ZW Simbabwe |
| <input type="checkbox"/> KP Demokratische Volksrepublik Korea | |
| <input checked="" type="checkbox"/> KR Republik Korea | |
| <input type="checkbox"/> KZ Kasachstan | |
| <input type="checkbox"/> LC Saint Lucia | |
| <input type="checkbox"/> LK Sri Lanka | |

Kästchen für die Bestimmung von Staaten, die dem PCT nach der Veröffentlichung dieses Formblatts beigetreten sind:

Erklärung bzgl. vorsorglicher Bestimmungen: Zusätzlich zu den oben genannten Bestimmungen nimmt der Anmelder nach Regel 4.9 Absatz b auch alle anderen nach dem PCT zulässigen Bestimmungen vor mit Ausnahme der im Zusatzfeld genannten Bestimmungen, die von dieser Erklärung ausgenommen sind. Der Anmelder erklärt, daß diese zusätzlichen Bestimmungen unter dem Vorbehalt einer Bestätigung stehen und jede zusätzliche Bestimmung, die vor Ablauf von 15 Monaten ab dem Prioritätsdatum nicht bestätigt wurde, nach Ablauf dieser Frist als vom Anmelder zurückgenommen gilt. (Die Bestätigung einer Bestimmung erfolgt durch die Einreichung einer Mitteilung, in der diese Bestimmung angegeben wird, und die Zahlung der Bestimmungs- und der Bestätigungsgebühr. Die Bestätigung muß beim Anmeldeamt innerhalb der Frist von 15 Monaten eingehen.)


Feld Nr. VI PRIORITÄTSANSPRUCH		<input type="checkbox"/> Weitere Prioritätsansprüche sind im Zusatzfeld angegeben.		
Anmeldedatum der früheren Anmeldung (Tag/Monat/Jahr)	Aktenzeichen der früheren Anmeldung	Ist die frühere Anmeldung eine:		
		ationale Anmeldung: Staat	regionale Anmeldung: regionales Amt	internationale Anmeldung: Anmeldeamt
Zeile (1) 22/02/1999	199 07 567.0	Deutschland		
Zeile (2)				
Zeile (3)				

☐ Das Anmeldeamt wird ersucht, eine beglaubigte Abschrift der oben in der (den) Zeile(n) _____ bezeichneten früheren Anmeldung(en) zu erstellen und dem internationalen Büro zu übermitteln (nur falls die frühere Anmeldung(en) bei dem Amt eingereicht worden ist(sind), das für die Zwecke dieser internationalen Anmeldung Anmeldeamt ist)

* Falls es sich bei der früheren Anmeldung um eine ARIPO-Anmeldung handelt, so muß in dem Zusatzfeld mindestens ein Staat angegeben werden, der Mitgliedstaat der Pariser Verbandsübereinkunft zum Schutz des gewerblichen Eigentums ist und für den die frühere Anmeldung eingereicht wurde.

Feld Nr. VII INTERNATIONALE RECHERCHENBEHÖRDE	
Wahl der internationalen Recherchenbehörde (ISA) <i>(falls zwei oder mehr als zwei internationale Recherchenbehörden für die Ausführung der internationalen Recherche zuständig sind, geben Sie die von Ihnen gewählte Behörde an; der Zweibuchstaben-Code kann benutzt werden):</i> ISA /	Antrag auf Nutzung der Ergebnisse einer früheren Recherche; Bezugnahme auf diese frühere Recherche (falls eine frühere Recherche bei der internationalen Recherchenbehörde beantragt oder von ihr durchgeführt worden ist): Datum (Tag/Monat/Jahr) Aktenzeichen Staat (oder regionales Amt)

Feld Nr. VIII KONTROLLISTE; EINREICHUNGSSPRACHE	
Diese internationale Anmeldung enthält die folgende Anzahl von Blättern: Antrag : 04 Beschreibung (ohne Sequenzprotokollteil) : 28 Ansprüche : 04 Zusammenfassung : 01 Zeichnungen : 03 Sequenzprotokollteil der Beschreibung : 11 Blattzahl insgesamt : 51	Dieser internationalen Anmeldung liegen die nachstehend angekreuzten Unterlagen bei: 1. <input checked="" type="checkbox"/> Blatt für die Gebührenberechnung 2. <input checked="" type="checkbox"/> Gesonderte unterzeichnete Vollmacht 3. <input type="checkbox"/> Kopie der allgemeinen Vollmacht; Aktenzeichen (falls vorhanden): 4. <input type="checkbox"/> Begründung für das Fehlen einer Unterschrift 5. <input checked="" type="checkbox"/> Prioritätsbeleg(e), in Feld Nr. VI durch folgende Zeilennummer gekennzeichnet: 6. <input type="checkbox"/> Übersetzung der internationalen Anmeldung in die folgende Sprache: 7. <input type="checkbox"/> Gesonderte Angaben zu hinterlegten Mikroorganismen oder anderem biologischen Material 8. <input checked="" type="checkbox"/> Protokoll der Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenzen in computerlesbarer Form 9. <input type="checkbox"/> Sonstige (einzeln auflisten):
Abbildung der Zeichnungen, die mit der Zusammenfassung veröffentlicht werden soll (Nr.): 1	Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht wird: Deutsch

Feld Nr. IX UNTERSCHRIFT DES ANMELDERS ODER DES ANWALTS	
Der Name jeder unterzeichnenden Person ist neben der Unterschrift zu wiederholen, und es ist anzugeben, sofern sich dies nicht eindeutig aus dem Antrag ergibt, in welcher Eigenschaft die Person unterzeichnet.	
	
München, den 19.02.2000	
Dr. Petra Pielken	

Vom Anmeldeamt auszufüllen	
1. Datum des tatsächlichen Eingangs dieser internationalen Anmeldung:	2. Zeichnungen <input type="checkbox"/> eingegangen: <input type="checkbox"/> nicht eingegangen:
3. Geändertes Eingangsdatum aufgrund nachträglich, jedoch fristgerecht eingegangener Unterlagen oder Zeichnungen zur Vervollständigung dieser internationalen Anmeldung:	
4. Datum des fristgerechten Eingangs der angeforderten Richtigstellungen nach Artikel 11(2) PCT:	
5. Internationale Recherchenbehörde (falls zwei oder mehr zuständig sind): ISA /	6. <input type="checkbox"/> Übermittlung des Recherchenexemplars bis zur Zahlung der Recherchegebühr aufgeschoben

Vom Internationalen Büro auszufüllen
Datum des Eingangs des Aktenexemplars beim Internationalen Büro:

"Express Mail" mailing label
number **EK219526023**

Date of Deposit
-AUGUST 21, 2001-

I hereby certify that this paper or fee is
being deposited with the United States Postal
Service "Express Mail Post Office to
Addressee" service under 37CFR 1.10 on the
date indicated above and is addressed to **BOX**
PCT, Commissioner for Patents,
Washington, D.C. 20231
-Amy L. Hamm-

(Typed or printed name of person mailing
paper or fee)

(Signature of person mailing paper or fee)

METHOD
FOR
MICROBIALY
PRODUCING
L-VALINE

Lothar Eggeling

-and-

Hermann Sahm

INTERNATIONAL APPLICATION
[In German]

PCT/EP00/01405 IFD: 02/21/2000

-with-

Three (3) Sheets of Drawings

-and-

(11) Sheets of Sequence Listings

PT 1.1678 (JÜLICH-13) ... (5899*13)

"Express Mail" mailing label
number EK219526023

Date of Deposit
-AUGUST 21, 2001-

I hereby certify that this paper or fee is
being deposited with the United States Postal
Service "Express Mail Post Office to
Addressee" service under 37CFR 1.10 on the
date indicated above and is addressed to Box
PCT, Commissioner for Patents,
Washington, D.C. 20231

-Amy L. Hamm-

(Typed or printed name of person mailing
paper or fee)

(Signature of person mailing paper or fee)


```

graph TD
    A[Homoserine kinase  
(thrB)] --> B[Homoserine-phosphate]
    B --> C[Threonine synthase  
(thrC)]
    C --> D[L-Threonine]
    D --> E[Threonine dehydratase  
(thrA)]
    E --> F[L-Ketobutyrate]
    F --> G[Pyruvate]
    G --> H[Acetylhydroxyacid synthase  
(ilvB, ilvH)]
    H --> I[Acetylhydroxybutyrate]
    I --> J[Isomeroreductase  
(ilvC)]
    J --> K[Dihydroxymethylvalerate]
    K --> L[Dihydroxyacid dehydratase  
(ilvD)]
    L --> M[Ketomethylvalerate]
    M --> N[Transaminase]
    N --> O[L-Isoleucine]
    O --> P[Permease]
    P --> Q[L-Isoleucine]
    Q --> R[Aspartate]
    R --> S[Aspartate decarboxylase]
    S --> T[Pantoinsre]
    T --> U[Pantothenate ligase  
(panC)]
    U --> V[Pantothinate]
    V --> W[L-Isoleucine]
    F --> X[Pyruvate]
    X --> Y[Acetolactate]
    Y --> Z[Dihydroxyisovalerate]
    Z --> AA[Ketolisovalerate]
    AA --> AB[L-Valine]
    AA --> AC[Ketopantoate]
    AC --> AD[Ketopantoate hydrazymethyl transferase  
(panB)]
    AD --> AE[Ketopantoate]
    AE --> AF[Ketopantoate reductase]
    AF --> AG[Pantoinsre]
    AG --> U
    AA --> AH[Isopropylmalate synthase  
(leuA)]
    AH --> AI[Isopropylmalate]
    AI --> AJ[Isopropylmalate dehydratase  
(leuC, leuD)]
    AJ --> AK[Isopropylmalate]
    AK --> AL[Isopropylmalate dehydrogenase  
(leuB)]
    AL --> AM[Ketoisocaproate]
    AM --> AN[Transaminase]
    AN --> AO[L-Leucine]
  
```

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

5

Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von L-Valin

Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur mikrobiellen
10 Herstellung von L-Valin nach Anspruch 1 bis 13 sowie auf im Verfahren
einsetzbare, transformierte Zellen bzw. Mikroorganismen nach Anspruch 14
bis 17.

Die Aminosäure L-Valin stellt ein kommerziell bedeutendes Produkt dar,
15 das in der Tierernährung, der Humanernährung und der Medizin
Anwendung findet. Es besteht daher ein allgemeines Interesse daran,
verbesserte Verfahren zur Herstellung von L-Valin bereitzustellen.

Valin kann durch chemische Synthese oder biotechnologisch durch
20 Fermentation geeigneter Mikroorganismen in geeigneten Nährlösungen
hergestellt werden. Der Vorteil der biotechnologischen Herstellung durch
Mikroorganismen liegt in der Bildung der korrekten stereo-isomeren Form,
nämlich der L-Form von Valin frei von D-Valin.

25 Verschiedene Arten von Bakterien, wie z. B. Escherichia coli, Serratia
marcescens, Corynebacterium glutamicum, Brevibacterium flavum oder
Brevibacterium lactofermentum können in einer Nährlösung, die Glucose
enthält, L-Valin produzieren. US 5 658 766 zeigt, daß bei Escherichia coli
durch Mutation in der Aminoacyl-tRNA-Synthetase eine gesteigerte Bildung

5 von L-Valin erreicht werden kann. WO 96 06926 zeigt weiterhin, dass durch eine Liponsäure-Auxotrophie eine Steigerung der L-Valinbildung mit Escherichia coli erreicht werden kann. EP 0 694 614 A1 beschreibt Stämme von Escherichia coli, die Resistenzen gegenüber α -Ketobuttersäure tragen und in einer Nährlösung, die Glucose enthält, L-Valin, L-Isoleucin oder L-Leucin produzieren.

10

In EP 0 477 000 wird gezeigt, daß durch Mutagenese von Corynebacterium oder Brevibacterium und Selektion auf Valin-Resistenz die L-Valinbildung verbessert werden kann. In derselben EP-Schrift wird auch gezeigt, dass durch Selektion von Corynebacterium oder Brevibacterium auf Resistenz
15 gegenüber verschiedenen Pyruvat-Analoga, wie β -Fluoropyruvat, β -Chloropyruvat, β -Mercaptopyruvat oder Trimethylpyruvat eine verbesserte L-Valinbildung erreicht werden kann. Durch Nakayama et al. (Nakayama et al., 1961, J. Gen. Appl. Microbiol. Jpn) ist bekannt, daß durch ungerichtete Mutationen eingeführte Auxotrophien zu verbesserter L-Valinakkumulation
20 führen können.

In EP 0 356 739 A1 wird darüber hinaus gezeigt, dass bei Amplifikation des für die Acetohydroxysäuresynthase (ilvBN, siehe auch Figur 1) kodierenden DNA-Bereichs mittels des Plasmids pAJ220V3 die Bildung von L-Valin
25 verbessert wird.

Es ist Aufgabe der vorliegenden Erfindung, neue Grundlagen zur mikrobiellen Herstellung von L-Valin, insbesondere mit Hilfe coryneformer Bakterien, bereitzustellen.

5 Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß dadurch gelöst, daß die Dihydroxysäuredehydratase- (ilvD-) Aktivität und/oder die ilvD-Genexpression in einem Mikroorganismus verstärkt wird. Alternativ dazu oder in Kombination damit wird die Acetohydroxysäuresynthase- (ilvBN-) und Isomero-reduktase- (ilvC-) Aktivität und/oder die ilvBNC-Genexpression in einem Mikroorganismus verstärkt. Für die
10 erfindungsgemäßen Verfahren können zusätzlich Mikroorganismen zum Einsatz kommen, in denen die Aktivität zumindest eines Enzyms, das an einem Stoffwechselweg beteiligt ist, der die L-Valinbildung herabsetzt, abgeschwächt oder ausgeschaltet ist. So werden in den erfindungsgemäßen Verfahren vorzugsweise Mikroorganismen mit einer Defektmutation im
15 Threonindehydratase- (ilvA-) Gen und/oder mit einer Defektmutation in einem oder mehreren Genen der Pantothenatsynthese eingesetzt.

Mit den Begriffen "Valin" oder "L-Valin" ist im Sinne der beanspruchten Erfindung nicht nur die freie Säure, sondern auch das Salz davon, wie z.B.
20 das Calcium-, Natrium-, Ammonium- oder Kaliumsalz, gemeint.

Der Begriff „Verstärkung“ beschreibt die Erhöhung der intrazellulären Aktivität der genannten Enzyme ilvD, ilvB, ilvN und ilvC. Zur Erhöhung der Enzymaktivität wird insbesondere die endogene Aktivität im
25 Mikroorganismus erhöht. Eine Erhöhung der Enzymaktivität kann beispielsweise erreicht werden, indem durch Veränderung des katalytischen Zentrums ein erhöhter Substratumsatz erfolgt oder indem die Wirkung von Enzyminhibitoren aufgehoben wird. Auch kann eine erhöhte Enzymaktivität durch Erhöhung der Enzymsynthese, beispielsweise durch Genamplifikation

oder durch Ausschaltung von Faktoren, die die Enzymbiosynthese reprimieren, hervorgerufen werden. Die endogene Enzymaktivität wird
5 erfindungsgemäß vorzugsweise durch Mutation des entsprechenden endogenen Gens erhöht. Derartige Mutationen können entweder nach klassischen Methoden ungerichtet erzeugt werden, wie beispielsweise UV-Bestrahlung oder mutationsauslösenden Chemikalien, oder gezielt mittels
10 gentechnologischer Methoden, wie Deletion(en), Insertion(en) und/oder Nukleotidaustausch(e).

Die Verstärkung der Genexpression erfolgt erfindungsgemäß vorzugsweise durch Erhöhung der Genkopienzahl. Dazu wird das Gen bzw. werden die
15 Gene in ein Genkonstrukt bzw. in einen Vektor eingebaut, der vorzugsweise den Genen zugeordnete regulatorische Gensequenzen enthält, insbesondere solche, die die Genexpression verstärken. Anschließend wird ein Mikroorganismus, vorzugsweise *Corynebacterium glutamicum*, mit den entsprechenden Genkonstrukten transformiert.

20 Es wurde festgestellt, daß durch verstärkte Expression des Valinbiosynthesegens *ilvD* aus *Corynebacterium glutamicum*, welches für das Enzym Dihydroxysäuredehydratase kodiert, in verbesserter Weise L-Valin produziert wird. Erfindungsgemäss bewirken neben der verstärkten
25 Expression dieses Gens auch die verstärkte Expression der *ilvBN*-Gene, die für das Enzym Acetohydroxysäuresynthase kodieren, und des *ilvC*-Gens, das für das Enzym Isomeroreduktase kodiert, in *Corynebacterium glutamicum* eine verbesserte L-Valinbildung. Eine weitere Verbesserung der L-Valinbildung wird durch Überexpression aller genannten Gene in

5 Corynebacterium glutamicum erreicht. Die Gene oder Genkonstrukte können im Wirtsorganismus entweder in Plasmiden mit unterschiedlicher Kopienzahl vorliegen oder im Chromosom integriert und amplifiziert sein.

Eine weitere Erhöhung der Genexpression kann - alternativ oder kombiniert mit einer Erhöhung der Genkopienzahl - durch Verstärkung regulatorischer Faktoren, die die Genexpression positiv beeinflussen, bewirkt werden. So
10 kann eine Verstärkung regulatorischer Elemente auf Transkriptionsebene erfolgen, indem insbesondere verstärkte Transkriptionssignale verwendet werden. Auch kann die Promotor- und Regulationsregion, die sich stromaufwärts des Strukturgens befindet, mutiert werden. In gleicher Weise
15 wirken Expressionskassetten, die stromaufwärts des Strukturgens eingebaut werden. Durch induzierbare Promotoren ist es zusätzlich möglich die Expression im Verlaufe der fermentativen L-Valinbildung zu steigern. Daneben ist aber auch eine Verstärkung der Translation möglich, indem beispielsweise die Stabilität der m-RNA verbessert wird. Desweiteren
20 können Gene verwendet werden, die für das entsprechende Enzym mit einer hohen Aktivität kodieren. Alternativ kann weiterhin eine Überexpression der betreffenden Gene durch Veränderung der Medienzusammensetzung und Kulturführung erreicht werden. Anleitungen hierzu findet der Fachmann unter anderem bei Martin et al. (Bio/Technology 5, 137-146
25 (1987)), bei Guerrero et al. (Gene 138, 35-41 (1994)), Tsuchiya und Morinaga (Bio/Technology 6, 428-430 (1988)), bei Eikmanns et al. (Gene 102, 93-98 (1991)), in der Europäischen Patentschrift EP 0 472 869, im US Patent 4,601,893, bei Schwarzer und Pühler (Bio/Technology 9, 84-87 (1991)), bei Reinscheid et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 126-132

5 (1994)), bei LaBarre et al. (Journal of Bacteriology 175, 1001-1007 (1993)) und in der Patentanmeldung WO 96/15246.

Für eine Verstärkung der Genexpression sind ebenso alle denkbaren Kombinationen der oben genannten Maßnahmen möglich.

10 Mikroorganismen, die im erfindungsgemäßen Verfahren einsetzbar sind, können L-Valin aus Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke, Cellulose oder aus Glycerin und Ethanol herstellen. Es kann sich um Gram-positive Bakterien z. B. der Gattung Bacillus oder um coryneforme Bakterien der bereits erwähnten Gattung
15 Corynebacterium oder auch um Arthrobacter handeln. Bei der Gattung Corynebacterium wurde insbesondere bereits die Art Corynebacterium glutamicum genannt, die in der Fachwelt für ihre Fähigkeit bekannt ist Aminosäuren zu bilden. Zu dieser Art gehören Wildtypstämme, wie z. B. Corynebacterium glutamicum ATCC13032, Brevibacterium flavum
20 ATCC14067, Brevibacterium lactofermentum ATCC13869, Brevibacterium thiogenitalis ATCC19240, Corynebacterium melassecola ATCC17965 und andere.

25 Zur Isolierung des Gens *ilvD* von Corynebacterium glutamicum oder anderer Gene wird zunächst eine Genbank angelegt. Das Anlegen von Genbanken ist in allgemein bekannten Lehrbüchern und Handbüchern niedergeschrieben. Als Beispiel seien das Lehrbuch von Winnacker: Gene und Klone, Eine Einführung in die Gentechnologie (Verlag Chemie, Weinheim, Deutschland, 1990) oder das Handbuch von

5 Sambrook et al.: Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) genannt. Eine bekannte Genbank ist die des *E. coli* K-12 Stammes W3110, die von Kohara et al. (Cell 50, 495 - 508 (1987)) die in λ -Vektoren angelegt wurde. Bathe et al. (Molecular and General Genetics, 252:255-265, 1996) beschreiben eine Genbank von *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032, die mit Hilfe des
10 Cosmidvektors SuperCos I (Wahl et al., 1987, Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 84:2160-2164) im *E. coli* K-12 NM554 (Raleigh et al., 1988, Nucleic Acids Research 16:1563-1575) angelegt wurde. Zur Herstellung einer Genbank von *Corynebacterium glutamicum* in *Escherichia coli* können auch Plasmide wie pBR322
15 (Bolivar, Life Sciences, 25, 807-818 (1979)) oder pUC19 (Norrandar et al., 1983, Gene, 26: 101-106) verwendet werden. Zur Herstellung einer Genbank von *Corynebacterium glutamicum* in *Corynebacterium glutamicum* können Plasmide wie pJC1 (Cremer et al., Mol. Gen. Genet. (1990) 220: 3221-3229) oder pECM2 (Jäger et al., J. Bacteriol. (1992) 174:
20 5462-5465) verwendet werden. Als Wirte eignen sich besonders solche Bakterien-Stämme, die restriktions- und rekombinationsdefekt sind. Ein Beispiel hierfür ist der Stamm *Escherichia coli* DH5 α *mc*r, der von Grant et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 87 (1990) 4645-4649) beschrieben wurde, oder der Stamm
25 *Corynebacterium glutamicum* R127, der von Liebl et al. isoliert wurde (FEMS Lett (1989) 65: 299-304).

Die Genbank wird anschließend in einen Indikatorstamm durch
5 Transformation (Hanahan, Journal of Molecular Biology 166, 557-580,
1983) oder Elektroporation (Tauch et.al., 1994, FEMS Microbiological
Letters, 123:343-347) eingebaut. Der Indikatorstamm zeichnet sich
dadurch aus, dass er eine Mutation in dem interessierenden Gen
10 besitzt, die einen detektierbaren Phänotyp, z.B. eine Auxotrophie,
hervorrufen. Die Indikatorstämme bzw. Mutanten sind aus publizierten
Quellen oder Stammsammlungen erhältlich oder müssen gegebenenfalls
selbst hergestellt werden. Im Rahmen der vorliegenden Erfindung ist
die *Corynebacterium glutamicum* Mutante R127/7 isoliert worden, die
15 in dem für die Dihydroxysäuredehydratase kodierendem *ilvD*-Gen
defekt ist. Nach Transformation des Indikatorstammes, wie z.B. der
ilvD-Mutante R127/7, mit einem rekombinanten Plasmid, welches das
interessierende Gen, wie z.B. das *ilvD*-Gen trägt und Expression
desselben, wird der Indikatorstamm bezüglich der entsprechenden
Eigenschaft, wie z.B. der L-Valin-Bedürftigkeit, prototroph.

20 Das dergestalt isolierte Gen bzw. DNA-Fragment kann durch
Bestimmung der Sequenz, wie z.B. bei Sanger et al. (Proceedings of the
National of Sciences of the United States of America USA, 74:5463-5467,
1977) beschrieben, charakterisiert werden. Anschließend kann der Grad
25 an Identität zu bekannten Genen, die in Datenbanken wie z.B. der
GenBank (Benson et al., 1998, Nucleic Acids Research, 26:1-7) enthalten
sind, mit publizierten Methoden analysiert werden (Altschul et al.,
1990, Journal of Molecular Biology 215:403-410).

Auf diese Weise wurde die für das Gen *ilvD* kodierende DNA-Sequenz
5 von *Corynebacterium glutamicum* erhalten, die als SEQ ID NO 1
Bestandteil der vorliegenden Erfindung ist. Weiterhin wurden aus der
vorliegenden DNA-Sequenz mit den oben beschriebenen Methoden die
Aminosäuresequenzen der entsprechenden Enzyme abgeleitet. In SEQ
ID NO 2 ist die sich ergebende Aminosäuresequenz des *ilvD*-
10 Genproduktes, nämlich der Dihydroxysäuredehydratase, dargestellt.

Das dergestalt charakterisierte Gen kann anschließend einzeln oder in
Kombination mit anderen in einem geeigneten Mikroorganismus zur
Expression gebracht werden. Eine bekannte Methode, Gene zu
15 exprimieren bzw. überzuexprimieren, besteht darin, diese mit Hilfe
von Plasmidvektoren zu amplifizieren, die überdies mit
Expressionssignalen ausgestattet sein können. Als Plasmidvektoren
kommen solche in Frage, die in den entsprechenden Mikroorganismen
replizieren können. Für *Corynebacterium glutamicum* kommen z.B. die
20 Vektoren pEKEx1 (Eikmanns et al., Gene 102:93-98 (1991)) oder pZ8-1
(Europäische Patentschrift 0 375 889) oder pEKEx2 (Eikmanns et al.
Microbiology 140: 1817-1828 (1994) oder pECM2 (Jäger et al. Journal of
Bacteriology 174(16): 5462-5465 (1992)) in Frage. Beispiele für derartige
Plasmide sind pJC1ilvD, pECM3ilvBNCD, und pJC1ilvBNCD. Diese
25 Plasmide sind *Escherichia coli*/*Corynebacterium glutamicum*
Pendelvektor die das Gen *ilvD* bzw. das Gen *ilvD* zusammen mit den
Genen *ilvB*, *ilvN*, und *ilvC* tragen.

Die Erfinder haben weiterhin gefunden, dass sich die Verstärkung des
5 Gens einzeln oder in Kombination mit den Genen *ilvB*, *ilvN* und *ilvC* in
solchen Mikroorganismen vorteilhaft auswirkt, die eine reduzierte
Synthese der Aminosäure L-Isoleucin aufweisen. Diese reduzierte
Synthese kann durch Deletion des *ilvA*-Gens erreicht werden, das für
das für die L-Isoleucinsynthese spezifische Enzym
10 Threonindehydratase kodiert.

Die Deletion kann durch gerichtete rekombinante DNA-Techniken
erfolgen. Mit Hilfe dieser Methoden kann zum Beispiel das für die
Threonindehydratase kodierende *ilvA*-Gen im Chromosom deletiert
15 werden. Geeignete Methoden dazu sind bei Schäfer et al. (Gene (1994)
145: 69-73) oder auch Link et al. (Journal of Bacteriology (1998) 179:
6228-6237) beschrieben. Auch können nur Teile des Gens deletiert
werden, oder auch mutierte Fragmente des Threonindehydratasegens
ausgetauscht werden. Durch Deletion wird so ein Verlust der
20 Threonindehydrataseaktivität erreicht. Ein Beispiel für eine derartige
Mutante ist der *Corynebacterium glutamicum* Stamm
ATCC13032 Δ *ilvA*, der eine Deletion im *ilvA*-Gen trägt.

Die Erfinder haben weiterhin gefunden, dass sich die Verstärkung der
25 Gene *ilvD*, *ilvB*, *ilvN* und *ilvC* in einer weiteren Kombination mit der
reduzierten Synthese von D-Pantothenat, vorzugsweise in Kombination
mit weiterer Deletion des *ilvA*-Gens, in Mikroorganismen vorteilhaft
auf die L-Valinbildung auswirkt, so zum Beispiel durch Deletionen im
panB- und *panC*-Gen. Die reduzierte D-Pantothenatsynthese kann

5 durch Abschwächung oder Ausschaltung der entsprechenden Biosyntheseenzyme bzw. Ihrer Aktivitäten erreicht werden. Hierfür kommen zum Beispiel die Enzyme Ketopantoathydroxymethyltransferase (EC 2.1.2.11), Ketopantoatreduktase, Pantothenatligase (EC 6.3.2.1) und die Aspartatdecarboxylase (EC 4.1.1.11) in Frage. Eine Möglichkeit, 10 Enzyme und deren Aktivitäten auszuschalten oder abzuschwächen, sind Mutageneseverfahren.

Hierzu gehören ungerichtete Verfahren, die chemische Reagenzien, wie z.B. N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidin, oder auch UV-Bestrahlung 15 zur Mutagenese benutzen, mit anschließender Suche der gewünschten Mikroorganismen auf Bedürftigkeit für D-Pantothenat. Verfahren zur Mutationsauslösung und Mutantensuche sind allgemein bekannt und können unter anderem bei Miller (A Short Course in Bacterial Genetics, A Laboratory Manual and Handbook for Escherichia coli and Related 20 Bacteria (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1992)) oder im Handbuch "Manual of Methods for General Bacteriology" der American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981) nachgelesen werden.

25 Weiterhin gehören hierzu gerichtete rekombinante DNA-Techniken. Mit Hilfe dieser Methoden können zum Beispiel die für die Ketopantoathydroxymethyltransferase, Pantothenatligase, Ketopantoinsäurereduktase oder Aspartatdecarboxylase kodierenden Gene panB, panC, panE und panD einzeln oder auch gemeinsam im

Chromosom deletiert werden. Geeignete Methoden dazu sind bei
5 Schäfer et al. (Gene (1994) 145: 69-73) oder auch Link et al. (Journal of
Bacteriology (1998) 179: 6228-6237) beschrieben. Auch können nur Teile
der Gene deletiert werden oder auch mutierte Fragmente der
Ketopantoathydroxymethyltransferase, Pantothenatligase,
Ketopantoinsäurereduktase und der Aspartatdecarboxylase
10 ausgetauscht werden. Durch Deletion oder Austausch wird so ein
Verlust oder eine Reduktion der jeweiligen Enzymaktivität erreicht. Ein
Beispiel für eine derartige Mutante ist der Corynebacterium
glutamicum Stamm ATCC13032 Δ panBC, der eine Deletion im panBC
Operon trägt.

15 Die erfindungsgemäß hergestellten Mikroorganismen können
kontinuierlich oder diskontinuierlich im batch Verfahren
(Satzkultivierung) oder im fed batch (Zulaufverfahren) oder repeated
fed batch Verfahren (repetitives Zulaufverfahren) zum Zwecke der L-
20 Valin-Produktion kultiviert werden. Eine Zusammenfassung über
bekannte Kultivierungsmethoden sind im Lehrbuch von Chmiel
(Bioprozesstechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik (Gustav
Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) oder im Lehrbuch von Storhas
(Bioreaktoren und periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag,
25 Braunschweig/Wiesbaden, 1994)) beschrieben.

Das zu verwendende Kulturmedium muß in geeigneter Weise den
Ansprüchen der jeweiligen Mikroorganismen genügen.
Beschreibungen von Kulturmedien verschiedenener Mikroorganismen

sind im Handbuch "Manual of Methods for General Bacteriology" der
5 American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981)
enthalten. Als Kohlenstoffquelle können Zucker und Kohlehydrate wie
z.B. Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke
und Cellulose, Öle und Fette wie z. B. Sojaöl, Sonnenblumenöl,
Erdnussöl und Kokosfett, Fettsäuren wie z. B. Palmitinsäure,
10 Stearinsäure und Linolsäure, Alkohole wie z. B. Glycerin und Ethanol
und organische Säuren wie z. B. Essigsäure verwendet werden. Diese
Stoffe können einzeln oder als Mischung verwendet werden. Als
Stickstoffquelle können organische Stickstoff-haltige Verbindungen wie
Peptone, Hefeextrakt, Fleischextrakt, Malzextrakt, Maisquellwasser,
15 Sojabohnenmehl und Harnstoff oder anorganische Verbindungen wie
Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat,
Ammoniumcarbonat und Ammoniumnitrat verwendet werden. Die
Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung verwendet werden.
Als Phosphorquelle können Kaliumdihydrogenphosphat oder
20 Dikaliumhydrogenphosphat oder die entsprechenden Natrium
haltigen Salze verwendet werden. Das Kulturmedium muß weiterhin
Salze von Metallen enthalten, wie z.B. Magnesiumsulfat oder
Eisensulfat, die für das Wachstum notwendig sind. Schließlich können
essentielle Wuchsstoffe, wie Aminosäuren und Vitamine, zusätzlich zu
25 den oben genannten Stoffen eingesetzt werden. Die genannten
Einsatzstoffe können zur Kultur in Form eines einmaligen Ansatzes
hinzugegeben oder in geeigneter Weise während der Kultivierung
zugefüttert werden.

5 Zur pH-Kontrolle der Kultur werden basische Verbindungen wie Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Ammoniak oder saure Verbindungen wie Phosphorsäure oder Schwefelsäure in geeigneter Weise eingesetzt. Zur Kontrolle der Schaumentwicklung können Antischaummittel, wie z.B. Fettsäurepolyglykolester, eingesetzt werden. Zur Aufrechterhaltung der Stabilität von Plasmiden können
10 dem Medium geeignete selektiv wirkende Stoffe, z.B. Antibiotika, hinzugefügt werden. Um aerobe Bedingungen aufrechtzuerhalten werden Sauerstoff oder Sauerstoff-haltige Gasmischungen, wie z.B. Luft, in die Kultur eingetragen. Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise bei 20°C bis 50°C und vorzugsweise bei 25°C bis 45°C.
15 Die Kultur wird solange fortgesetzt, bis sich ein Maximum an L-Valin gebildet hat. Dieses Ziel wird normalerweise innerhalb von 10 Stunden bis 160 Stunden erreicht.

Die Konzentration an gebildetem L-Valin kann mit bekannten
20 Verfahren (Jones und Gilligan (1983) Journal of Chromatography 266: 471-482) bestimmt werden.

Die Erfindung wird anhand der folgenden Ausführungsbeispiele näher erläutert:

Beispiel 1: Klonierung, Sequenzierung und Expression des für die Dihydroxysäuredehydratase kodierenden *ilvD*-Gens aus *Corynebacterium glutamicum*

1. Isolierung einer *ilvD* Mutante von *Corynebacterium glutamicum*

Der Stamm *Corynebacterium glutamicum* R127 (Haynes 1989, FEMS Microbiology Letters 61: 329-334) wurde mit N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidin mutagenisiert (Sambrook et al., Molecular cloning. A laboratory manual (1989) Cold Spring Harbour Laboratory Press). Dazu wurden 5 ml einer über Nacht angezogenen *Corynebacterium glutamicum* Kultur mit 250 µl N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidin (5 mg /ml Dimethylformamid) versetzt und 30 Minuten bei 30 °C und 200 Upm inkubiert (Adelberg 1958, Journal of Bacteriology 76: 326). Die Zellen wurden anschließend zweimal mit steriler NaCl-Lösung (0,9 %) gewaschen. Durch Replikaplattierung auf Minimalmediumplatten CGXII mit 15 g/l Agar (Keilhauer et al., Journal of Bacteriology 175: 5595-5603) wurden Mutanten isoliert, die nur bei Zugabe von L-Valin, L-Isoleucin und L-Leucin (je 0,1 g/l) wuchsen.

Die Enzymaktivität der Dihydroxysäuredehydratase wurde im Rohextrakt dieser Mutanten bestimmt. Dazu wurden die Klone in 60 ml LB-Medium kultiviert und in der exponentiellen Wachstumsphase abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde einmal mit 0,05 M Kaliumphosphatpuffer gewaschen und im selben Puffer resuspendiert. Der Zellaufschluß erfolgte mittels 10 minütiger Ultraschallbehandlung (Branson-Sonifier W-250, Branson Sonic

Power Co, Danbury, USA). Anschließend wurden die Zelltrümmer durch
5 eine 30 minütige Zentrifugation bei 13000 rpm und 4 °C abgetrennt und der
Überstand als Rohextrakt in den Enzymtest eingesetzt. Der Reaktionsansatz
des Enzymtests enthielt 0,2 ml 0,25 M Tris/HCl, pH 8, 0,05 ml Rohextrakt,
und 0,15 ml 65 mM alpha,ß-Dihydroxy-ß-methylvalerat. Die Testansätze
wurden bei 30 °C inkubiert, nach 10, 20 und 30 Minuten wurde je 200 µl
10 Proben genommen und deren Ketomethylvaleratkonzentration mittels
HPLC-Analytik bestimmt (Hara et al. 1985, Analytica Chimica Acta 172: 167-
173). Wie Tabelle 1 zeigt, weist der Stamm R127/7 keine
Dihydroxysäuredehydrataseaktivität auf, wogegen die Isomero-reduktase-
und Acetohydroxysäuresynthaseaktivitäten als weitere Enzyme der
15 Synthese der verzweigtkettigen Aminosäuren noch vorhanden sind.

Tabelle 1

Spezifische Aktivitäten (µmol/min und mg Protein) von
Valinbiosyntheseenzymen in *Corynebacterium glutamicum* Stämmen

20

Stamm	Dihydroxysäure dehydratase	Isomero reduktase	Acetohydroxysäure synthase
R127	0,003	0,05	0,07
R127/7	0,000	0,06	0,09

2. Klonierung des ilvD-Gens von *Corynebacterium glutamicum*

25

Chromosomale DNA aus *Corynebacterium glutamicum* R127 wurde, wie bei
Schwarzer und Pühler (Bio/Technology 9 (1990) 84-87) beschrieben, isoliert.

5 Diese wurde mit dem Restriktionsenzym Sau3A (Boehringer Mannheim)
gespalten und durch Saccharose-Dichte-Gradienten-Zentrifugation
(Sambrook et al., Molecular cloning. A laboratory manual (1989) Cold Spring
Harbour Laboratory Press) aufgetrennt. Die Fraktion mit dem
Fragmentgrößenbereich von etwa 6-10 kb wurde zur Ligation mit dem
10 Vektor pJC1 (Cremer et al., Molecular and General Genetics 220 (1990) 478-
480) eingesetzt. Der Vektor pJC1 wurde hierzu mit BamHI linearisiert und
dephosphoryliert. Fünf ng davon wurden mit 20 ng der genannten Fraktion
der chromosomalen DNA ligiert und damit die Mutante R127/7 durch
Elektroporation (Haynes und Britz, FEMS Microbiology Letters 61 (1989)
15 329-334) transformiert. Die Transformanten wurden auf die Fähigkeit
getestet, auf CGXII Agarplatten ohne Zugabe der verzweigt-kettigen
Aminosäuren wachsen zu können. Von über 5000 getesteten
Transformanten wuchsen nach Replicaplattierung und zweitägiger
Inkubation bei 30°C 8 Klone auf Minimalmediumplatten. Von diesen Klonen
20 wurden Plasmidpräparationen, wie bei Schwarzer et al. (Bio/Technology
(1990) 9: 84-87) beschrieben durchgeführt. Restriktionsanalysen der Plasmid-
DNA ergaben, daß in allen 8 Klonen dasselbe Plasmid, im Folgendem pRV
genannt, enthalten war. Das Plasmid trägt ein Insert von 4,3 kb und wurde
durch Retransformation auf seine Fähigkeit die ilvD-Mutante R127/7 zu
komplementieren getestet. Durch Subklonierung wurde der für die
25 Komplementation der Mutante R127/7 verantwortliche Bereich auf ein 2,9
ScaI/XhoI-Fragment eingegrenzt (Figur 2).

3. Sequenzierung des ilvD-Gens

5

Die Nukleinsäuresequenz des 2,9 kb ScaI/XhoI-Fragments wurde nach der Dideoxy-Kettenabbruchmethode von Sanger et al. durchgeführt (Proceedings of the National of Sciences of the United States of America USA (1977) 74: 5463-5467). Dabei wurde der Auto-Read Sequencing kit verwendet (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden). Die gelelektrophoretische Analyse erfolgte mit dem automatischem Laser-Fluoreszenz Sequenziergerät (A.L.F.) von Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Schweden). Die erhaltene Nukleotidsequenz wurde mit dem Programmpaket HUSAR (Release 4.0, EMBL, Cambridge, GB) analysiert. Die Nukleotidsequenz ist als ID SEQ NO 1 wiedergegeben. Die Analyse ergab ein offenes Leseraster von 1836 Basenpaaren, das als ilvD-Gen identifiziert wurde und für ein Polypeptid von 612 Aminosäuren kodiert, das als SEQ ID NO 2 wiedergegeben ist.

20

4. Expression des ilvD-Gens

25

Das Plasmid pRV wurde mit den Restriktionsenzymen ScaI und XhoI, entsprechend den Angaben des Herstellers der Restriktionsenzyme, verdaut (Roche, Boehringer Mannheim). Anschließend wurde das 2,9 kb ilvD Fragment mittels Ionenaustauschersäulchen isoliert (Quiagen, Hilden). Das überhängende Ende des XhoI Schnitts des isolierten Fragmentes wurde mit Klenow Polymerase aufgefüllt. Der Vektor pJC1 (Cremer et al., Mol. Gen. Genet (1990)220:478-480) wurde PstI-geschnitten, ebenfalls mit Klenow Polymerase behandelt, und anschließend Fragment und Vektor ligiert. Mit

dem Ligationsansatz wurde der *E. coli* Stamm DH5 α mcr (Grant et al.,
5 Proceedings of the National of Sciences of the United States of America USA,
87 (1990) 4645-4649) transformiert (Hanahan, Journal of Molecular Biology
166 (1983) 557-580). Durch Plasmidpräparationen (Sambrook et al.,
Molecular cloning. A laboratory manual (1989) Cold Spring Harbour
Laboratory Press) von Klonen wurde ein Klon identifiziert, der das
10 rekombinante Plasmid pJC1ilvD enthielt. Mit diesem Plasmid wurde
Corynebacterium glutamicum ATCC13032 mittels Elektroporation
transformiert, wie bei Haynes et al. (1989, FEMS Microbiol. Lett. 61: 329-334)
beschrieben. Von *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 pJC1 und
Corynebacterium glutamicum ATCC13032 pJC1ilvD wurde anschließend die
15 durch ilvD kodierte Dihydroxysäuredehydrataseaktivität bestimmt. Dazu
wurden die Klone in 60 ml LB-Medium kultiviert und in der exponentiellen
Wachstumsphase abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde einmal mit 0,05 M
Kaliumphosphatpuffer gewaschen und im selben Puffer resuspendiert. Der
Zellaufschluß erfolgte mittels 10 minütiger Ultraschallbehandlung (Branson-
20 Sonifier W-250, Branson Sonic Power Co, Danbury, USA). Anschließend
wurden die Zelltrümmer durch eine 30 minütige Zentrifugation bei 13000
rpm und 4 °C abgetrennt und der Überstand als Rohextrakt in den
Enzymtest eingesetzt. Der Reaktionsansatz des Enzymtests enthielt 0,2 ml
0,25 M Tris/HCl, pH 8, 0,05 ml Rohextrakt, und 0,15 ml 65 mM alpha, β -
25 Dihydroxy- β -methylvalerat. Die Testansätze wurden bei 30 °C inkubiert,
nach 10, 20 und 30 Minuten wurde je 200 μ l Proben genommen und deren
Ketomethylvaleratkonzentration mittels HPLC-Analytik bestimmt (Hara et

al. 1985, Analytica Chimica Acta 172: 167-173). Wie Tabelle 2 zeigt, weist der
5 Stamm *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 pJC1ilvD eine gesteigerte
Dihydroxysäuredehydrataseaktivität gegenüber dem Kontrollstamm auf.

Tabelle 2

Spezifische Aktivität ($\mu\text{mol}/\text{min}$ und mg Protein) der
10 Dihydroxysäuredehydratase in *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032

Plasmid	Dihydroxysäure dehydratase
pJC1	0,008
pJC1ilvD	0,050

15 **Beispiel 2: Konstruktion einer *ilvA* Deletionsmutante von
*Corynebacterium glutamicum***

Die interne Deletion des *ilvA*-Gens von *Corynebacterium glutamicum*
ATCC13032 wurde mit dem bei Schäfer et al. (Gene 145: 69-73 (1994))
beschriebenen System zum Genaustausch durchgeführt. Zur Konstruktion
20 des Inaktivierungsvektors pK19mobsacB Δ ilvA wurde zunächst aus dem auf
einem EcoRI-Fragment im Vektor pBM21 (Möckel et al. 1994, Molecular
Microbiology 13: 833-842) vorliegenden *ilvA*-Gen ein internes 241 bp BglII-
Fragment entfernt. Hierzu wurde der Vektor mit BglII geschnitten und, nach
Abtrennung des *ilvA* internen BglII-Fragmentes mittels
25 Agarosegelelektrophorese, religiert. Anschließend wurde aus dem Vektor

das unvollständige Gen als EcoRI-Fragment isoliert und in den mit EcoRI
5 linearisierten Vektor pK19mobsacB (Schäfer 1994, Gene 145: 69-73) ligiert.
Der erhaltene Inaktivierungsvektor pK19mobsacB Δ ilvA wurde durch
Transformation in den E. coli Stamm S 17-1 eingebracht (Hanahan 1983,
Journal of Molecular Biology 166: 557-580) und per Konjugation nach
10 Corynebacterium glutamicum ATCC13032 transferiert (Schäfer et al. 1990,
Journal of Bacteriology 172: 1663-1666). Es wurden Kanamycin-resistente
Klone von Corynebacterium glutamicum erhalten, bei denen der
Inaktivierungsvektor im Genom integriert vorlag. Um auf die Excision des
Vektors zu selektionieren, wurden Kanamycin-resistente Klone auf
15 Saccharose-haltigem LB-Medium (Sambrook et al., Molecular cloning. A
laboratory manual (1989) Cold Spring Harbour Laboratory Press) mit 15 g/l
Agar, 2% Glucose/ 10% Saccharose ausplattiert und Kolonien erhalten,
welche den Vektor durch ein zweites Rekombinationsereignis wieder
verloren haben (Jäger et al. 1992, Journal of Bacteriology 174: 5462-5465).
Durch Überimpfen auf Minimalmediumplatten (Medium CGXII mit 15 g/l
20 Agar (Keilhauer et al., Journal of Bacteriology 175 (1993) 5595-5603) mit und
ohne 2 mM L-Isoleucin bzw. mit und ohne 50 μ g/ml Kanamycin wurden 36
Klone isoliert, welche durch die Excision des Vektors Kanamycin sensitiv
und Isoleucin auxotroph waren und bei denen nun das unvollständige ilvA
Gen (Δ ilvA-Allel) im Genom vorlag. Ein Stamm wurde als ATCC13032 Δ ilvA
25 bezeichnet und weiter verwendet.

Beispiel 3: Klonierung der Gene der Pantothenatbiosynthese panB und panC aus *C. glutamicum*

Klonierung des Operons

Chromosomale DNA von *C. glutamicum* ATCC13032 wurde isoliert und mit der Restriktionsendonuklease Sau3A geschnitten. Nach gelektrophoretischer Auftrennung wurden DNA-Fragmente in einem Größenbereich von 3 bis 7 bzw. von 9 bis 20 kb extrahiert und nachfolgend in die singuläre BamHI Schnittstelle des Vektors pBR322 ligiert. Inserttragende Kolonien wurden anhand ihrer Tetracyclinsensitivität nach Überimpfen auf LB-Platten mit 10 µg/ml Tetracyclin isoliert. Durch Plasmidpräparationen (Sambrook et al., Molecular cloning. A laboratory manual (1989) Cold Spring Harbour Laboratory Press) von gepoolten Klonen wurden 8 Plasmidpools, welche je 400 Plasmide mit einer Insertgröße von 9 bis 20 kb und 9 Plasmidpools, welche je 500 Plasmide mit einer Insertgröße von 3 bis 7 kb enthielten, isoliert. Die *E. coli* panB Mutante SJ2 (Cronan et al. 1982, J. Bacteriol. 149: 916-922) wurde mit dieser Genbank mittels Elektroporation (Wehrmann et al. 1994, Microbiology 140: 3349-3356) transformiert. Die Transformationsansätze wurden direkt auf CGXII-Medium (J. Bacteriol. (1993) 175: 5595-5603) ausplattiert. Von Klonen, welche in der Lage waren ohne Pantothenatsupplementation zu wachsen, wurde Plasmid-DNA isoliert (Sambrook et al. 1989) und durch Retransformation wurden 8 Klone erhalten, deren D-Pantothenatbedürftigkeit bestätigt wurde. Mit den 8 Plasmiden wurde eine Restriktionskartierung durchgeführt. Einer der untersuchten Vektoren, im Folgendem pUR1 genannt enthielt ein Insert von

9,3 kb (Figur 3). Die Transformation der *E. coli* panC_Mutante DV39 (Vallari
5 et al. 1985, J. Bacteriol. 164: 136-142) ergab, daß der Vektor pUR1 ebenfalls in
der Lage war, den panC Defekt dieser Mutante zu komplementieren. Ein 2,2
kb großes Fragment des Inserts von pUR1 wurde nach der Dideoxy-
Kettenabbruchmethode von Sanger et al. sequenziert (Proc. Natl. Acad. Sci.
USA (1977) 74: 5463-5467). Die gelelektrophoretische Analyse erfolgte mit
10 dem automatischem Laser-Fluoreszenz Sequenziergerät (A.L.F.) von
Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Schweden). Die erhaltene
Nukleotidsequenz wurde mit dem Programmpaket HUSAR (Release 4.0,
EMBL, Cambridge, GB) analysiert. Die Nukleotidsequenz ist als SEQ ID No.
3 wiedergegeben. Die Analyse ergab die Identifizierung von zwei offenen
15 Leserastern. Ein offenes Leseraster umfaßt 813 Basenpaare und weist hohe
Homologien zu bereits bekannten panB-Genen aus anderen Organismen
aufweist. Das panB-Gen aus *C. glutamicum* kodiert für ein Polypeptid von
271 Aminosäuren (siehe SEQ ID No. 4). Das zweite offene Leseraster umfaßt
837 Basenpaare und weist hohe Homologien zu bereits bekannten panC-
20 Genen aus anderen Organismen aufweist. Das panC-Gen aus *C. glutamicum*
kodiert für ein Polypeptid von 279 Aminosäuren (siehe SEQ ID No. 5).

Beispiel 4: Konstruktion einer panBC Deletionsmutante von *Corynebacterium glutamicum*

25

Das genomische panBC-Fragment von *Corynebacterium glutamicum*
ATCC13032 sowie *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 Δ ilvA wurde
mit dem bei Schäfer et al. (Gene 145: 69-73 (1994)) beschriebenen System zum
Genaustausch durchgeführt. Zur Konstruktion des Deletionsvektors

pK19mobsacB Δ panBC wurde zunächst das 3.95 kb große SspI/SalI Fragment
5 mit panBC mit pUC18 ligiert, der zuvor SmaI/SalI geschnitten worden war.
Anschließend wurde ein 1293 bp großes EcoRV/NruI Fragment aus dem
überlappenden Bereich der panBC Gene durch Restriktionsverdau und
Religation entfernt. Um die Umklonierung in pK19mobsacB zu ermöglichen,
wurde mit den 2 Primern 5'-GAGAACTTAATCGAGCAACACCCCTG, 5'-
10 GCGCCACGCCTAGCCTTGGCCCTCAA und der
Polymerasekettenreaktion (PCR) der deletierte panBC-Bereich in pUC18
amplifiziert, um so ein 0,5 kb Δ panBC Fragment zu erhalten, das an den
Enden eine SalI, bzw. EcoRI Schnittstelle trägt. Die PCR wurde nach
Sambrook et al. (Molecular cloning. A laboratory manual (1989) Cold Spring
15 Harbour Laboratory Press) mit einer Annealingtemperatur von 55 °C
durchgeführt. Das erhaltene Fragment wurde mit dem Vektor pK19mobsac
ligiert, der zuvor EcoRI/SalI geschnitten und mit alkalischer Phosphatase
behandelt worden war. Der erhaltene Inaktivierungsvektor
pK19mobsacB Δ panBC wurde durch Transformation in den Escherichia coli
20 Stamm S 17-1 eingebracht (Hanahan (1983) J. Mol. Biol. 166: 557-580) und per
Konjugation nach Corynebacterium glutamicum ATCC13032 transferiert
(Schäfer et al. (1990) J. Bacteriol. 172: 1663-1666). Es wurden Kanamycin-
resistente Klone von Corynebacterium glutamicum erhalten, bei denen der
Inaktivierungsvektor im Genom integriert vorlag. Um auf die Excision des
25 Vektors zu selektionieren, wurden Kanamycin-resistente Klone auf
Saccharose-haltigem LB-Medium (Sambrook et al., Molecular cloning. A
laboratory manual (1989) Cold Spring Harbour Laboratory Press) mit 15 g/l
Agar, 2% Glucose/ 10% Saccharose ausplattiert und Kolonien erhalten,
welche den Vektor durch ein zweites Rekombinationsereignis wieder

verloren haben (Jäger et al. 1992, Journal of Bacteriology 174: 5462-5465).
5 Durch Überimpfen auf Minimalmediumplatten (Medium CGXII mit 15 g/l
Agar (Keilhauer et al., Journal of Bacteriology 175 (1993) 5595-5603) mit und
ohne 2 mM L-Isoleucin bzw. mit und ohne 50 µg/ml Kanamycin wurden 36
Klone isoliert, welche durch die Excision des Vektors Kanamycin sensitiv
und Isoleucin auxotroph waren und bei denen nun die Sequenz der
10 unvollständigen pan Gene (Δ panBC-Allele) im Genom vorlag. Ein Stamm
wurde als ATCC13032 Δ panBC bezeichnet. Auf die gleiche Weise wie in
diesem Beispiel detailliert beschrieben wurde auch die panBC Deletion in
ATCC13032 Δ ilvA eingeführt, um den Stamm ATCC13032 Δ ilvA Δ panBC zu
erhalten.

15
**Beispiel 5: Expression der Gene ilvD, ilvBN, und ilvC in
Corynebacterium glutamicum**

Die Gene der Acetohydroxysäuresynthase (ilvBN) und der
20 Isomero-reduktase (ilvC) (Cordes et al. 1992, Gene 112: 113-116 und Keilhauer
et al. 1993, Journal of Bacteriology 175: 5595-5603) und der
Dihydroxysäuredehydratase (ilvD) (Beispiel 1) wurden zur Expression in
den Vektor pECM3 kloniert. Der Vektor pECM3 ist ein Derivat von pECM2
(Jäger et al. 1992, Journal of Bacteriology 174: 5462-5465), das durch Deletion
25 des ca. 1 kbp langen BamHI/BglII DNA-Fragmentes entstand, welches das
Kanamycinresistenzgen trägt.

5 In dem Vektor pKK5 (Cordes et al. 1992, Gene 112: 113-116) lagen die Gene
ilvBNC bereits im Vektor pJC1 (Cremer et al. 1990, Molecular and General
Genetics 220: 478-480) kloniert vor. Aus diesem wurde ein 5,7 kb XbaI-
ilvBNC-Fragment isoliert und zusammen mit einem, das ilvD-Gen
enthaltende, 3,1 kb-XbaI Fragment des Vektors pRV in den mit XbaI
linearisierten Vektor pECM3 eingebracht. Der Ligationsansatz wurde hierbei
10 in den E. coli Stamm DH5 α mcr transformiert. Aus einem Klon wurde das
Plasmid pECM3ilvBNCD erhalten.

Mittels Elektroporation (Haynes 1989, FEMS Microbiology Letters 61: 329-
334) und Selektion auf Chloramphenicolresistenz (3 μ g/ml) wurde das
15 Plasmid pECM3ilvBNCD in den Stamm ATCC13032 Δ ilvA eingebracht und
der Stamm ATCC13032 Δ ilvA/pECM3ilvBNCD erhalten.

20 **Beispiel 6: Produktion von L-Valin mit verschiedenen Corynebacterium glutamicum Stämmen**

Zur Untersuchung ihrer Valinbildung wurden die in Tabelle 4 angegebenen
Stämme in 60 ml Brain Heart Infusion-Medium (Difco Laboratories, Detroit,
USA) für 14 h bei 30 °C vorkultiviert. Anschließend wurden die Zellen
25 einmal mit 0,9% NaCl-Lösung (w/v) gewaschen und mit dieser Suspension
je 60 ml CgXII-Medium so angeimpft, daß die OD600 0,5 betrug. Das
Medium war identisch mit dem bei Keilhauer et al., (Journal of Bacteriology
(1993) 175: 5595-5603) beschriebenen Medium. Für die Kultivierung der
 Δ ilvA Stämme enthielt das Medium aber zusätzlich 250 mg/l L-Isoleucin. Es
30 ist in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3

5 Zusammensetzung des Mediums CGXII

Komponente	Konzentration
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	20 g/L
Harnstoff	5 g/L
KH_2PO_4	1 g/L
K_2HPO_4	1 g/L
$\text{Mg}_2\text{O}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,25 g/L
3-Morpholinopropansulfonsäure	42 g/L
CaCl_2	10 mg/L
$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	10 mg/L
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	10 mg/L
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	1 mg/L
CuSO_4	0,2 mg/L
$\text{NiCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	0,02 mg/L
Biotin (pH7)	0,2 mg/L
Glukose	40 g/L
Protokatechusäure	0,03 mg/L

10 Nach 48 stündiger Kultivierung wurden Proben genommen, die Zellen abzentrifugiert und der Überstand sterilfiltriert. Die L-Valinkonzentration des Überstands wurde mit Hilfe der Hochdruckflüssigchromatografie mit integrierter Vorsäulenderivatisierung der Aminosäure mit o-Phthdialdehyd

5 wie bei Jones und Gilligan (J. Chromatogr. 266 (1983) 471-482) bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 4

10 L-Valinproduktion mit verschiedenen *Corynebacterium glutamicum* Stämmen

C. glutamicum	L-Valin (mM)
ATCC 13032	0,5
ATCC 13032 pJC1ilvD	2,2
ATCC 13032 pJC1ilvBNC	20,0
ATCC 13032 pJC1ilvBNCD	26,2
ATCC 13032 Δ ilvA	2,7
ATCC 13032 Δ ilvA pJC1ilvD	7,0
ATCC 13032 Δ ilvA pJC1ilvBNCD	28,5
ATCC 13032 Δ panBC	8,2
ATCC 13032 Δ ilvA Δ panBC	31,1
ATCC 13032 Δ ilvA Δ panBC pJC1ilvBNCD	72,7

Patentansprüche

5

1. Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von L-Valin, bei dem die Dihydroxysäuredehydratase- (ilvD-) Aktivität und/oder die ilvD-Genexpression in einem Mikroorganismus verstärkt wird.

10

2. Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von L-Valin, bei dem die Acetohydroxysäuresynthase- (ilvBN-) und Isomero-reduktase- (ilvC-) Aktivität und/oder die ilvBNC-Genexpression in einem Mikroorganismus verstärkt wird.

15

3. Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von L-Valin nach Anspruch 1 und 2.

4. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche,

20

dadurch gekennzeichnet,
daß die endogene ilvD- und/oder ilvBNC-Aktivität im Mikroorganismus erhöht wird.

5. Verfahren nach Anspruch 4,

25

dadurch gekennzeichnet,
daß durch Mutation des endogenen ilvD-Gens und/oder der ilvBNC-Gene entsprechende Enzyme mit höherer Aktivität erzeugt werden.

- 5 6. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche,
 dadurch gekennzeichnet,
 daß die ilvD- und/oder ilvBNC-Genexpression durch Erhöhen der Genkopienzahl verstärkt wird.
- 10 7. Verfahren nach Anspruch 6,
 dadurch gekennzeichnet,
 daß zur Erhöhung der Genkopienzahl das ilvD-Gen und/oder die ilvBNC-Gene in ein Genkonstrukt eingebaut werden.
- 15 8. Verfahren nach Anspruch 7,
 dadurch gekennzeichnet,
 daß ein Mikroorganismus mit dem das ilvD-Gen und/oder die ilvBNC-Gene enthaltende Genkonstrukt transformiert wird.
- 20 9. Verfahren nach Anspruch 8,
 dadurch gekennzeichnet,
 daß als Mikroorganismus *Corynebacterium glutamicum* verwendet wird.
- 25 10. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche,
 dadurch gekennzeichnet,
 daß ein Mikroorganismus verwendet wird, in dem die Aktivität

5 zumindest eines Enzyms, das an einem Stoffwechselweg beteiligt ist,
der die L-Valin-Bildung herabsetzt, abgeschwächt oder ausgeschaltet
ist.

11. Verfahren nach Anspruch 10,
dadurch gekennzeichnet,
10 daß die Aktivität des an der Synthese von L-Isoleucin beteiligten
Enzyms Threonindehydratase (ilvA) abgeschwächt oder ausgeschaltet
ist.

12. Verfahren nach Anspruch 10 oder 11,
15 dadurch gekennzeichnet,
daß die Aktivität eines oder mehrerer, an der Synthese von D-
Pantothenat spezifisch beteiligter Enzyme abgeschwächt oder
ausgeschaltet ist.

20 13. Verfahren nach Anspruch 12,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Aktivität des Enzyms Ketopantoathydroxymethyltransferase
(pan B) und/oder des Enzyms Pantothenatligase (pan C) abgeschwächt
oder ausgeschaltet ist.

25 14. Mit einem Genkonstrukt, enthaltend das ilvD-Gen und/oder
die ilvBNC-Gene, transformierter Mikroorganismus, in dem die
Aktivität eines oder mehrerer, an der Synthese von D-Panthotenat
spezifisch beteiligter Enzyme abgeschwächt oder ausgeschaltet ist.

- 5 15. Transformierter Mikroorganismus nach Anspruch 14, in dem die Aktivität des Enzyms Ketopantoathydroxymethyltransferase (pan B) und/oder des Enzyms Pantothenatligase (pan C) abgeschwächt oder ausgeschaltet ist.
- 10 16. Transformierter Mikroorganismus nach Anspruch 14 oder 15, in dem die Aktivität des an der Synthese von L-Isoleucin beteiligten Enzyms Threonindehydratase (ilvA) abgeschwächt oder ausgeschaltet ist.
- 15 17. Transformierter Mikroorganismus nach einem oder mehreren der Ansprüche 14 bis 16,
gekennzeichnet durch
Corynebacterium glutamicum.

SEQUENZPROTOKOLL

JC03 Rec'd PCT/PTO 21 AUG 2001

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:

(A) NAME: Forschungszentrum Juelich
GmbH (B) STRASSE: Postfach 1913
(C) ORT: Juelich
(E) LAND: Deutschland
(F) POSTLEITZAHL: 52425
(G) TELEFON: 02461/614480
(H) TELEFAX: 02461/612860

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG:

Valinherstellung

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 5

(iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

(A) DATENTRÄGER: Floppy disk
(B) COMPUTER: IBM PC
compatible (C)
BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-
DOS

(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 2952 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

AGTACTTGGA GCGCCAAAAG GCACTGGGCA AGCCAGTTCA GTTGAAGTTC GATGACGACA
CCGATGGGAA TACAACACAA ACAGAAAGCG TTGAATCCCA AGAGACCGGA CAAGCCGCGT
CTGAAACCTC ACATCGTGAT AACCTGCGT CACAGCACTA GAGTGTAATA AGCCGTCCGA
ACCAAAGGTC CACACCTCTG CACGAGTAGA AGCTCACCCA AGTTTTCAAA GTGCCGTTGA

TTCTTGACAA CCACCCGCCG CTCTTTAGAG CAGATTTGAA AAGCGCATCA TGATCCCACT
TCGTTCAAAA GTCACCACCG TCGGTCGCAA TGCAGCTGGC GCTCGCGCCC TTTGGCGTGC
CACCGGCACC AAGGAAAATG AGTTCGGCAA GCCAATTGTT GCCATCGTAA ACTCCTACAC
CCAGTTCGTG CCCGGACACG TTCACCTTAA GAACGTCGGC GATATTGTGG CAGATGCAGT
GCGCAAAGCC GGTGGCGTTC CAAAGGAATT CAACACCATC GTCGATGACG GCATCGCCAT
GGGACACGGC GGCATGCTGT ACTCCCTGCC ATCCCGTGAA ATCATCGCCG ACTCCGTCGA
ATACATGGTC AACGCACACA CCGCCGACGC CATGGTGTGT ATCTCCAACT GTGACAAGAT
CACCCCAGGC ATGCTCAACG CAGCAATGCG CCTGAACATC CCAGTGGTCT TCGTTTCCGG
TGGCCCAATG GAAGCTGGCA AGGCTGTCTG CGTTGAGCGC GTTGACACAG CACCAACCGA
CCTCATCACC GCGATCTCCG CATCCGCAAG CGATGCAGTC GACGACGCAG GCCTTGACAG
CGTTGAACGA TCCGCATGCC CAACCTGTGG CTCCTGCTCC GGTATGTTCA CCGCGAACTC
CATGAACTGC CTCACCGAAG CTCTGGGACT TTCTCTCCCG GGCAACGGCT CCACTCTGGC
AACCACGCA GCACGTCGCG CACTGTTTGA AAAGGCCGGC GAAACCGTCG TTGAACTGTG
CCGCCGCTAC TACGGTGAAG AAGACGAATC CGTTCTGCCA CGTGGCATTG CCACCAAGAA
GGCATTTCGAA AACGCAATGG CACTGGATAT GGCCATGGGT GGATCCACCA ACACCATCCT
CCACATCCTC GCAGCTGCCC AGGAAGGCGA AGTTGACTTC GACCTCGCAG ACATCGACGA
ACTGTCCAAA AACGTCCCCT GCCTGTCCAA GGTTGCACCA AACTCCGACT ACCACATGGA
AGACGTCCAC CGCGCCGGTC GCATTCCAGC ACTGCTCGGC GAGCTCAACC GCGGTGGCCT
GCTGAACAAG GACGTCCACT CCGTTCACTC CAACGACCTT GAAGGTTGGT TGGATGACTG
GGATATCCGC TCTGGCAAGA CCACCGAAGT AGCAACCGAA CTCTTCCACG CAGCCCCAGG
TGGCATCCGC ACCACCGAAG CATTCTCCAC CGAGAACCGC TGGGACGAAC TCGACACCGA
CGCTGCCAAG GGCTGCATCC GCGACGTTGA ACACGCCTAC ACCGCCGACG GCGGCCTGGT
TGTTCTTCGC GGCAACATCT CCCCTGACGG CGCAGTGATC AAGTCCGCAG GTATCGAAGA
AGAGCTGTGG AACTTCACCG GACCAGCACG AGTTGTGCGA AGCCAGGAAG AGGCAGTCTC
TGTCATCCTG ACCAAGACCA TCCAAGCTGG CGAAGTTCTG GTCGTCCGCT ACGAAGGCCC
ATCAGGTGGA CCAGGCATGC AGGAAATGCT TCACCCAACC GCATTCTCTA AGGGATCCGG
CCTGGGCAAG AAGTGTGCAC TGATCACCGA CGGCCGTTTC TCCGGAGGTT CCTCAGGACT

GTCCATCGGC CACGTCTCCC CAGAAGCAGC ACACGGCGGA GTCATTGGTC TGATCGAAAA
CGGCGACATC GTCTCCATCG ACGTTCACAA CCGCAAGCTC GAAGTTCAGG TCTCCGACGA
GGAACTCCAG CGCCGCCGCG ACGCTATGAA CGCCTCCGAG AAGCCATGGC AGCCAGTCAA
CCGTAACCGC GTTGTACCA AGGCACTGCG CGCATACGCA AAGATGGCTA CCTCCGCTGA
TAAGGGTGCA GTCCGTCAGG TCGACTAACC CTTTGTGAGT GTTTGAGCAC CGGTTCCCTA
CTTTGGGTTC CGGTGCTTTT TCATGTCTTG GCCTGTGTGG GCGTGGTGGA GCTCCCCGTT
GCAAATACTC ACCACAAGTT GCAGGATTTT TGCTGGTTGT GGTGGATTTT CCCGCTTTAT
AGCCCTATGC GTGCAACTTT CGGACCGATT CCAAAGGGCA AAGCCCTGTT TGTGGTGGAT
CCTTGCCCTG GAAGCTTTCA GGAACCACAA CTACCCCACT GACCCCAAAG TGGATAGGCC
CTATTCTTCC GTTTAAGCGC CTCAAACACC TCTCCCCACA CTTGACCCAT TAGGCAATTA
CGAATCCTTA AACAGCCTTC TACAGCACCA TGCCCCAAAC CGAACCCAGG CATGAAAAAG
ACCCTCACCA GGAGGGTCTT TTTCTAAAC TTTGGCTACG CGATTGGGTT CACACCCGCA
CCGAACCACC ACAGCAGAAC TGCCGCTGCG ATGCCGATGA CCACGAAGAT CCACGAGCTC
ACCAGTGGAC GCTTTGCCCA ACCTCGGCCA GAGTCAAGGG AAATCTTGCC GGGGCCGGTG
2700 AACTGAAGTC CGACAACCAC GATAGTGAGG ATCAGTGCCA GCATCAATGG CTCACTAAGT
2760 TCACCCCAAC CACCTTCATG AGTGTTGACT TGGTGAAGGG TGGTAAAGGA TGTCGCCACC
2820 GTGGCTACCG CTGCTGCCAC TGGGGTCATC AGACCAAGGA GCAGGAAGAC ACCAGCCGCA
2880 AGTTCAATAG ATGGAAGCAG GATCGCGAGG ATTTCAGGCC ACTGGTAACC AGCGAACTCT
2940 GCCTCGACTC TA

2952

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÉNGE: 612 AminosÑuren
- (B) ART: AminosÑure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÖLS: Protein

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

Met Ile Pro Leu Arg Ser Lys Val Thr Thr Val Gly Arg Asn Ala
 Ala 1 5 10
 15

Gly Ala Arg Ala Leu Trp Arg Ala Thr Gly Thr Lys Glu Asn Glu
 Phe 20 25 30

Gly Lys Pro Ile Val Ala Ile Val Asn Ser Tyr Thr Gln Phe Val
 Pro 35 40 45

Gly His Val His Leu Lys Asn Val Gly Asp Ile Val Ala Asp Ala
 Val 50 55 60

Arg Lys Ala Gly Gly Val Pro Lys Glu Phe Asn Thr Ile Val Asp
 Asp 65 70 75
 80

Gly Ile Ala Met Gly His Gly Gly Met Leu Tyr Ser Leu Pro Ser
 Arg 85 90
 95

Glu Ile Ile Ala Asp Ser Val Glu Tyr Met Val Asn Ala His Thr
 Ala 100 105 110

Asp Ala Met Val Cys Ile Ser Asn Cys Asp Lys Ile Thr Pro Gly
 Met 115 120 125

Leu Asn Ala Ala Met Arg Leu Asn Ile Pro Val Val Phe Val Ser
 Gly 130 135 140

Gly Pro Met Glu Ala Gly Lys Ala Val Val Val Glu Arg Val Ala
 His 145 150 155
 160

Ala Pro Thr Asp Leu Ile Thr Ala Ile Ser Ala Ser Ala Ser Asp
 Ala 165 170
 175

Val Asp Asp Ala Gly Leu Ala Ala Val Glu Arg Ser Ala Cys Pro
 Thr 180 185 190

Cys Gly Ser Cys Ser Gly Met Phe Thr Ala Asn Ser Met Asn Cys
 Leu 195 200 205

Thr Glu Ala Leu Gly Leu Ser Leu Pro Gly Asn Gly Ser Thr Leu
 Ala 210 215 220

Thr His Ala Ala Arg Arg Ala Leu Phe Glu Lys Ala Gly Glu Thr
 Val 225 230 235
 240

Val Glu Leu Cys Arg Arg Tyr Tyr Gly Glu Glu Asp Glu Ser Val

5

Leu 245 250
 255

Pro Arg Gly Ile Ala Thr Lys Lys Ala Phe Glu Asn Ala Met Ala
 Leu 260 265 270

Asp Met Ala Met Gly Gly Ser Thr Asn Thr Ile Leu His Ile Leu
 Ala 275 280 285

Ala Ala Gln Glu Gly Glu Val Asp Phe Asp Leu Ala Asp Ile Asp
 Glu 290 295 300

Leu Ser Lys Asn Val Pro Cys Leu Ser Lys Val Ala Pro Asn Ser
 Asp 305 310 315
 320

Tyr His Met Glu Asp Val His Arg Ala Gly Arg Ile Pro Ala Leu
 Leu 325 330
 335

Gly Glu Leu Asn Arg Gly Gly Leu Leu Asn Lys Asp Val His Ser
 Val 340 345 350

His Ser Asn Asp Leu Glu Gly Trp Leu Asp Asp Trp Asp Ile Arg
 Ser 355 360 365

Gly Lys Thr Thr Glu Val Ala Thr Glu Leu Phe His Ala Ala Pro
 Gly 370 375 380

Gly Ile Arg Thr Thr Glu Ala Phe Ser Thr Glu Asn Arg Trp Asp
 Glu 385 390 395
 400

Leu Asp Thr Asp Ala Ala Lys Gly Cys Ile Arg Asp Val Glu His
 Ala 405 410
 415

Tyr Thr Ala Asp Gly Gly Leu Val Val Leu Arg Gly Asn Ile Ser
 Pro 420 425 430

Asp Gly Ala Val Ile Lys Ser Ala Gly Ile Glu Glu Glu Leu Trp
 Asn 435 440 445

Phe Thr Gly Pro Ala Arg Val Val Glu Ser Gln Glu Glu Ala Val
 Ser 450 455 460

Val Ile Leu Thr Lys Thr Ile Gln Ala Gly Glu Val Leu Val Val
 Arg 465 470 475
 480

Tyr Glu Gly Pro Ser Gly Gly Pro Gly Met Gln Glu Met Leu His
 Pro 485 490
 495



Thr. Ala Phe Leu Lys Gly Ser Gly Leu Gly Lys Lys Cys Ala Leu
Ile 500 505 510

Thr Asp Gly Arg Phe Ser Gly Gly Ser Ser Gly Leu Ser Ile Gly
His 515 520 525

Val Ser Pro Glu Ala Ala His Gly Gly Val Ile Gly Leu Ile Glu
Asn 530 535 540

Gly Asp Ile Val Ser Ile Asp Val His Asn Arg Lys Leu Glu Val
Gln 545 550 555
560

Val Ser Asp Glu Glu Leu Gln Arg Arg Arg Asp Ala Met Asn Ala
 Ser 565 570
 575

Glu Lys Pro Trp Gln Pro Val Asn Arg Asn Arg Val Val Thr Lys
Ala 580 585 590

Leu Arg Ala Tyr Ala Lys Met Ala Thr Ser Ala Asp Lys Gly Ala
Val 595 600 605

Arg Gln Val Asp
610

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 2164 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÖLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

GCTTCGGGGT	ACCAATTCCT	TTAAGAACCA	TCAGATCAAT	CTGTTGTACA	TTCTCGGCCA
GATTCAGCTT	TTCGGTAAGG	ACGAAACACT	TTCACTTGAA	TCGGCAGCAA	AGTTTCTTAA
AGTTTCTAAG	GCAACTGCAA	CGAGGTATTT	TAGAACTCTC	CGAGAAATGG	AATTAGTTCA
CGAGGTCAGC	AAACGCCCTT	TGCGGTTTGC	GCTCACGGAT	AAAGGTCGTG	AGATAGTAGG
TCTTGAGGTA	AAAATTTGAC	TCCATAACGA	GAACCTAATC	GAGCAACACC	CCTGAACAGT
GAATCAAATC	GGAATTTATT	TATTCTGAGC	TGGTCATCAC	ATCTATACTC	ATGCCCATGT

CAGGCATTGA TGCAAAGAAA ATCCGCACCC GTCATTTCCG CGAAGCTAAA GTAAACGGCC
AGAAAGTTTC GGTTCACACC AGCTATGATG CGCTTTCGGC GCGCATTTTT GATGAGGCTG
GCGTCGATAT GCTCCTTGTT GGTGATTCCG CTGCCAACGT TGTGCTGGGT CCGGATACCA
CCTTGTCGAT CACCTTGGAT GAGATGATTG TGCTGGCCAA GCGGGTGACG ATCGCTACGA
AGCGTGCGCT TGTGGTGGTT GATCTGCCGT TTGGTACCTA TGAGGTGAGC CCAAATCAGG
CGGTGGAGTC CCGGATCCGG GTCATGCGTG AAACGGGTGC GGCTGCGGTG AAGATCGAGG
GTGGCGTGGA GATCGCGCAG ACGATTGCGAC GCATTGTTGA TGCTGGAATT CCGGTTGTGCG
GCCACATCGG GTACACCCCG CAGTCCGAGC ATTCCTTGGG CGGCCACGTG GTTCAGGGTC
GTGGCGCGAG TTCTGGAAAG CTCATCGCCG ATGCCCGCGC GTTGGAGCAG GCGGGTGCGT
TTGCGGTTGT GTTGGAGATG GTTCCAGCAG AGGCAGCGCG CGAGGTACC GAGGATCTTT

CCATCACCAC TATCGGAATC GGTGCCGGCA ATGGCACAGA TGGGCAGGTT TTGGTGTGGC
AGGATGCCTT CGGCCTCAAC CGCGGCAAGA AGCCACGCTT CGTCCGCGAG TACGCCACCT
TGGGCGATT CTTGCACGAC GCCGCGCAGG CCTACATCGC CGATATCCAC GCGGGTACCT
TCCCAGGCGA AGCGGAGTCC TTTTAATGCA GGTAGCAACC ACAAAGCAGG CGCTTATCGA
CGCCCTCCTC CACCACAAAT CCGTCGGGCT CGTCCCCACC ATGGGTGCGC TACACAGCGG
ACACGCCTCG TTGGTTAAAG CAGCACGCGC TGAAAACGAC ACTGTTGTAG CCAGTATTTT
TGTCAATCCC CTGCAGTTG AAGCACTCGG TGATTGCGAT GATTACCGCA ACTATCCCCG
CCAACTCGAC GCCGATTAG CACTGCTTGA AGAGGCAGGT GTGGATATTG TGTTCGCACC
CGATGTGGAG GAAATGTACC CCGGTGGCTT GCCACTAGTG TGGGCGCGCA CCGGTTCCAT
CGGAACAAAA TTGGAGGGTG CCAGCAGGCC TGGCCATTTT GATGGTGTGG CTACCGTGGT
GGCGAAGCTG TTCAATTGG TCGCCCTGA TCGTGATAT TTTGGACAAA AAGATGCTCA
GCAGGTTGCG GTGATTCGGC GATTGGTTGC CGATCTAGAC ATTCCCGTGG AGATTGCTCC
CGTTCCGATT ATTCGTGGCG CCGATGGCTT AGCCGAATCC AGCCGCAATC AACGTCTTTC
TGCGGATCAG CGAGCGCAAG CTCTGGTGCT GCCGCAGGTG TTGAGTGGGT TGCAGCGTCG
AAAAGCAGCT GGTGAAGCGC TAGATATCCA AGGTGCGCGC GACACCTTGG CCAGCGCCGA
CGGCGTGCGC TTGGATCACC TGGAAATTGT CGATCCAGCC ACCCTCGAAC CATTAGAAAT
CGACGGCCTG CTCACCCAAC CAGCGTTGGT GGTGCGCGCG ATTTTCGTGG GGCCGGTGCG

GTTGATCGAC AATATCGAGC TCTAGTACCA ACCCTGCGTT GCAGCACGCA GCTTCGCATA
 ACGCGTGCTC AGCTCAGTGT TTTTAGGTGC GCGGTGCGGA TCGGAACCGG GAGTTGGCCA
 CTGCGGTGGC GTGGCCTCAC CCGACAGCGC CCATGCCGCC TGACGAGCTG CACCCAACGC
 CACA 2164

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÉNGE: 271 AminosÑuren
- (B) ART: AminosÑure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÖLS: Protein

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

Met	Pro	Met	Ser	Gly	Ile	Asp	Ala	Lys	Lys	Ile	Arg	Thr	Arg	His
Phe 1				5					10					15
Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Asn	Gly	Gln	Lys	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Ser
Tyr				20				25				30		
Asp	Ala	Leu	Ser	Ala	Arg	Ile	Phe	Asp	Glu	Ala	Gly	Val	Asp	Met
		Leu 35						40					45	
Leu	Val	Gly	Asp	Ser	Ala	Ala	Asn	Val	Val	Leu	Gly	Arg	Asp	Thr
		Thr 50					55					60		
Leu	Ser	Ile	Thr	Leu	Asp	Glu	Met	Ile	Val	Leu	Ala	Lys	Ala	Val
Thr 65							70					75		
80														
Ile	Ala	Thr	Lys	Arg	Ala	Leu	Val	Val	Val	Asp	Leu	Pro	Phe	Gly
					Thr 85					90				
					95									
Tyr	Glu	Val	Ser	Pro	Asn	Gln	Ala	Val	Glu	Ser	Ala	Ile	Arg	Val
					Met 100				105				110	
Arg	Glu	Thr	Gly	Ala	Ala	Ala	Val	Lys	Ile	Glu	Gly	Gly	Val	Glu
					Ile 115				120				125	
Ala	Gln	Thr	Ile	Arg	Arg	Ile	Val	Asp	Ala	Gly	Ile	Pro	Val	Val

Gly 130	135	140
His Ile Gly Tyr Thr Pro Gln Ser Glu His Ser Leu Gly Gly His		
Val 145	150	155
160		
Val Gln Gly Arg Gly Ala Ser Ser Gly Lys Leu Ile Ala Asp Ala		
Arg 165	170	
175		
Ala Leu Glu Gln Ala Gly Ala Phe Ala Val Val Leu Glu Met Val		
Pro 180	185	190
Ala Glu Ala Ala Arg Glu Val Thr Glu Asp Leu Ser Ile Thr Thr		
Ile 195	200	205
Gly Ile Gly Ala Gly Asn Gly Thr Asp Gly Gln Val Leu Val Trp		
Gln 210	215	220
Asp Ala Phe Gly Leu Asn Arg Gly Lys Lys Pro Arg Phe Val Arg		
Glu 225	230	235
240		
Tyr Ala Thr Leu Gly Asp Ser Leu His Asp Ala Ala Gln Ala Tyr		
Ile 245	250	
255		
Ala Asp Ile His Ala Gly Thr Phe Pro Gly Glu Ala Glu Ser Phe		
260	265	270

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 279 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

Met Gln Val Ala Thr Thr Lys Gln Ala Leu Ile Asp Ala Leu Leu		
His 1	5	10
15		

His Lys Ser Val Gly Leu Val Pro Thr Met Gly Ala Leu His Ser

10

	Gly 20		25		30
His Ala Ser Leu Val Lys Ala Ala Arg Ala Glu Asn Asp Thr Val					
Val 35			40		45
Ala Ser Ile Phe Val Asn Pro Leu Gln Phe Glu Ala Leu Gly Asp					
Cys 50		55			60
Asp Asp Tyr Arg Asn Tyr Pro Arg Gln Leu Asp Ala Asp Leu Ala					
Leu 65		70		75	
80					
Leu Glu Glu Ala Gly Val Asp Ile Val Phe Ala Pro Asp Val Glu					
	Glu 85		90		
	95				
Met Tyr Pro Gly Gly Leu Pro Leu Val Trp Ala Arg Thr Gly Ser					
Ile 100		105			110
Gly Thr Lys Leu Glu Gly Ala Ser Arg Pro Gly His Phe Asp Gly					
Val 115		120			125
Ala Thr Val Val Ala Lys Leu Phe Asn Leu Val Arg Pro Asp Arg					
Ala 130		135			140
Tyr Phe Gly Gln Lys Asp Ala Gln Gln Val Ala Val Ile Arg Arg					
Leu 145		150		155	
160					
Val Ala Asp Leu Asp Ile Pro Val Glu Ile Arg Pro Val Pro Ile					
	Ile 165		170		
	175				
Arg Gly Ala Asp Gly Leu Ala Glu Ser Ser Arg Asn Gln Arg Leu					
Ser 180		185			190
Ala Asp Gln Arg Ala Gln Ala Leu Val Leu Pro Gln Val Leu Ser					
Gly 195		200			205
Leu Gln Arg Arg Lys Ala Ala Gly Glu Ala Leu Asp Ile Gln Gly					
Ala 210		215			220
Arg Asp Thr Leu Ala Ser Ala Asp Gly Val Arg Leu Asp His Leu					
Glu 225		230		235	
240					
Ile Val Asp Pro Ala Thr Leu Glu Pro Leu Glu Ile Asp Gly Leu					
	Leu 245		250		
	255				
Thr Gln Pro Ala Leu Val Val Gly Ala Ile Phe Val Gly Pro Val					
Arg 260		265			270
Leu Ile Asp Asn Ile Glu Leu					

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Ir. Application No

PCT/EP 00/01405

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12P13/06 C12N1/21

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12P C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP 0 136 359 A (KYOWA HAKKO KOGYO KK) 10 April 1985 (1985-04-10) the whole document	1-17
Y	EP 0 356 739 A (AJINOMOTO KK) 7 March 1990 (1990-03-07) cited in the application the whole document	1-17
Y	EP 0 436 886 A (KERNFORSCHUNGSANLAGE JUELICH) 17 July 1991 (1991-07-17) the whole document	1-17
Y	EP 0 872 547 A (AJINOMOTO KK) 21 October 1998 (1998-10-21) page 4, line 26 - line 45	1-17
-/-		

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

24 May 2000

Date of mailing of the international search report

14/06/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Van der Schaal, C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 00/01405

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>KEILHAUER C ET AL: "ISOLEUCINE SYNTHESIS IN CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM: MOLECULAR ANALYSIS OF THE ILVB-ILVN-ILVC OPERON" JOURNAL OF BACTERIOLOGY, US, WASHINGTON, DC, vol. 175, no. 17, 1 September 1993 (1993-09-01), pages 5595-5603, XP000611312 ISSN: 0021-9193 cited in the application the whole document</p>	2-17
Y	<p>LAWTHER R ET AL: "The complete nucleotide sequence of the ilvGMDA operon of E. coli K-12" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 15, no. 8, 1987, pages 2137-2155, XP002138603 OXFORD GB figure 1</p>	1-17
Y	<p>VELASCO JUAN A ET AL: "Cloning of the dihydroxyacid dehydratase-encoding gene (ILV3) from Saccharomyces cerevisiae." GENE (AMSTERDAM) 1993, vol. 137, no. 2, 1993, pages 179-185, XP002138604 ISSN: 0378-1119 the whole document</p>	1-17
Y	<p>DATABASE BIOSIS 'Online! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US1993 MILLER STANLEY L ET AL: "Prebiotic syntheses of vitamin coenzymes: II. Pantoic acid, pantothenic acid, and the composition of coenzyme A." Database accession no. PREV199395129991 XP002138606 abstract & JOURNAL OF MOLECULAR EVOLUTION 1993, vol. 36, no. 4, 1993, pages 308-314, ISSN: 0022-2844</p>	12-17
P, Y	<p>SAHM HERMANN ET AL: "D-pantothenate synthesis in Corynebacterium glutamicum and use of panBC and genes encoding L-valine synthesis for D-pantothenate overproduction." APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY MAY, 1999, vol. 65, no. 5, May 1999 (1999-05), pages 1973-1979, XP002138605 ISSN: 0099-2240 the whole document</p>	12-17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 00/01405

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member()	Publication date
EP 0136359 A	10-04-1985	JP 59156294 A	05-09-1984
		JP 1815738 C	18-01-1994
		JP 5023751 B	05-04-1993
		JP 59156292 A	05-09-1984
		JP 1994517 C	22-11-1995
		JP 7032710 B	12-04-1995
		JP 60024192 A	06-02-1985
		JP 1994519 C	22-11-1995
		JP 7032711 B	12-04-1995
		JP 60030693 A	16-02-1985
		JP 1815741 C	18-01-1994
		JP 5023752 B	05-04-1993
		JP 60034197 A	21-02-1985
		JP 1815743 C	18-01-1994
		JP 5023750 B	05-04-1993
		JP 60066989 A	17-04-1985
		AT 62272 T	15-04-1991
		AT 89316 T	15-05-1993
		AT 95838 T	15-10-1993
		AT 96170 T	15-11-1993
		AT 92103 T	15-08-1993
		AU 568340 B	24-12-1987
		AU 2572184 A	10-09-1984
		CA 1218025 A	17-02-1987
		DE 3484378 D	08-05-1991
		DE 3486147 A	17-06-1993
		DE 3486147 T	28-10-1993
		DE 3486188 A	02-09-1993
		DE 3486188 T	02-12-1993
		DE 3486229 D	18-11-1993
		DE 3486229 T	31-03-1994
		DE 3486232 D	25-11-1993
		DE 3486232 T	17-03-1994
		EP 0334391 A	27-09-1989
		EP 0336452 A	11-10-1989
		EP 0332233 A	13-09-1989
		EP 0332234 A	13-09-1989
		ES 529850 D	01-10-1985
		IL 70989 A	17-09-1990
		IT 1178859 B	16-09-1987
		WO 8403301 A	30-08-1984
		US 4927758 A	22-05-1990
		CA 1225051 A	04-08-1987
		CA 1218818 A	10-03-1987
		ES 529851 D	16-05-1985
		ES 8505410 A	01-09-1985
		IL 71145 A	16-09-1991
		IT 1178858 B	16-09-1987
		MX 7668 E	29-06-1990
		US 4874698 A	17-10-1989
EP 0356739 A	07-03-1990	JP 2042988 A	13-02-1990
		JP 2748418 B	06-05-1998
		DE 68925083 D	25-01-1996
		DE 68925083 T	05-09-1996
EP 0436886 A	17-07-1991	DE 3942947 A	27-06-1991
		DE 59005821 D	30-06-1994

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 00/01405

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0872547 A	21-10-1998	US 5888783 A WO 9606926 A	30-03-1999 07-03-1996